

**Efeito de dietas experimentais na sobrevivência de robalo-europeu
(*Dicentrarchus labrax*) infetado com *Tenacibaculum maritimum***

Ana Catarina Pantaleão Clemente

**Efeito de dietas experimentais na sobrevivência de robalo-europeu
(*Dicentrarchus labrax*) infetado com *Tenacibaculum maritimum***

Ana Catarina Pantaleão Clemente

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação realizada sob a orientação da Professora Especialista Teresa Baptista

Página deixada intencionalmente em branco

Título: Efeito de dietas experimentais na sobrevivência de robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*) infetado com *Tenacibaculum maritimum*

Copyright © Ana Catarina Pantaleão Clemente

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2025

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Página deixada intencionalmente em branco

Página deixada intencionalmente em branco

Abstract

Aquaculture is a rapidly expanding sector that faces significant challenges related to bacterial diseases, such as marine tenacibaculosis, caused by *Tenacibaculum maritimum*. The use of diets with immunomodulatory potential represents a promising approach, as it allows the simultaneous optimization of fish growth and resistance to infections. The present study aimed to evaluate the performance of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed experimental diets formulated by a commercial company, to determine whether these diets influence growth and modulate the immune response when fish are challenged with *T. maritimum* via immersion. For this purpose, seabass juveniles were fed for 34 days with four different diets and subsequently subjected to an immersion infection trial (5.5×10^6 CFU/mL, for 2 hours) with the A155 strain, isolated from *Solea senegalensis*. Growth parameters, antibody levels (determined by ELISA), and the presence of bacterial DNA in skin and gill tissues (detected by PCR) were assessed. Treatment B (diet 1) stood out for its best productive performance (higher specific growth rate (SGR) and lower feed conversion ratio (FCR)), whereas treatment D (diet 3) showed the lowest feed efficiency. However, these differences were not reflected in immunity, as ELISA tests did not reveal relevant antibody levels in any treatment. In the bacterial challenge, total survival and absence of clinical signs were recorded, with bacterial DNA being detected only within the first 24 h after infection and disappearing by 48 h, suggesting that the initial colonization was rapidly controlled. Thus, although the experimental diets influenced growth, they did not confer additional protection against *T. maritimum*. The absence of disease may be associated with the low virulence of the strain used, favorable environmental conditions, and the experimental design, highlighting the need for future trials with optimized infection models and a detailed characterization of diet composition.

Keywords: Aquaculture; Marine tenacibaculosis; *Dicentrarchus labrax*; Experimental diets; Immunonutrition.

Página deixada intencionalmente em branco

Resumo

A aquicultura é um setor em expansão que enfrenta desafios relacionados com doenças bacterianas, como a tenacibaculose marinha, causada por *Tenacibaculum maritimum*. A aplicação de dietas com potencial imunomodulador constitui uma abordagem promissora, ao permitir otimizar simultaneamente o crescimento e a resistência dos peixes. O presente estudo tem como objetivo avaliar o desempenho do robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*) submetido a dietas experimentais, formuladas por uma empresa comercial, de modo a determinar se estas influenciam o crescimento e potenciam a resposta imunitária dos peixes quando desafiados com *Tenacibaculum maritimum* por imersão. Para tal, juvenis de robalo-europeu foram alimentados durante 34 dias com 4 dietas distintas e, posteriormente, submetidos a um ensaio de infeção por imersão ($5,5 \times 10^6$ UFC/mL, durante 2 horas) com a estirpe A155, isolada de linguado-senegalês (*Solea senegalensis*). Foram avaliados os parâmetros de crescimento, os níveis de anticorpos (determinados por ELISA) e a presença de DNA bacteriano nos tecidos da pele e das brânquias (detetado por PCR). O tratamento B (dieta 1) destacou-se pelo melhor desempenho produtivo (taxa de crescimento específico (SGR) mais elevado e, índice de conversão alimentar (FCR) mais baixo), enquanto o tratamento D (dieta 3) apresentou a menor eficiência alimentar. No entanto, estas diferenças não se refletiram na imunidade, uma vez que os testes ELISA não revelaram níveis relevantes de anticorpos em nenhum tratamento. No desafio bacteriano, registou-se sobrevivência total e ausência de sinais clínicos, sendo o DNA bacteriano apenas detetado nas primeiras 24 h após a infeção, desaparecendo às 48 horas, o que sugere que a colonização inicial foi rapidamente controlada. Deste modo, embora as dietas experimentais tenham influenciado o crescimento, não conferiram proteção adicional contra *T. maritimum*. A ausência de doença poderá estar associada à baixa virulência da estirpe utilizada, às condições ambientais favoráveis e ao desenho experimental adotado, realçando a necessidade de futuros ensaios com modelos de infeção otimizados e caracterização detalhada da composição dietética.

Palavras-chave: Aquicultura, Tenacibaculose marinha, *Dicentrarchus labrax*, Dietas experimentais, Imunonutrição.

Página deixada intencionalmente em branco

Índice

Abstract.....	vii
Resumo	ix
Lista de abreviaturas.....	xiii
Lista de Figuras	xvi
Lista de Tabelas.....	xvii
1.Introdução	20
1.1. A importância da aquacultura e os seus desafios sanitários.....	20
1.2. <i>Tenacibaculum maritimum</i> : agente etiológico da tenacibaculose marinha	23
1.3. Resposta imunitária dos peixes	25
2. Materiais e Métodos.....	31
2.1. Detecção de Anticorpos Específicos por ELISA antes dos ensaios	31
2.2. Ensaio de alimentação.....	33
2.3. Infecção por imersão.....	35
2.4. Detecção de Anticorpos Totais e Específicos por ELISA após o ensaio de infecção	37
2.4.1. Detecção de Anticorpos Totais	38
2.4.2. Detecção de Anticorpos Específicos.....	38
2.5. Seleção e validação dos primers.....	39
2.6. Extração de DNA	40
2.6.1. Purificação adicional do DNA	41
2.7. Detecção de <i>T. maritimum</i> por PCR.....	41
2.8. Análise Estatística	42
3. Resultados.....	44
3.1. Detecção de Anticorpos Específicos por ELISA antes dos ensaios	44
3.2. Ensaio de alimentação.....	44
3.3. Infecção por imersão.....	45
3.4. Detecção de Anticorpos Totais e Específicos por ELISA após a infecção	45
3.4.1. Detecção de Anticorpos Totais	45
3.4.2. Detecção de Anticorpos Específicos após infecção	46
3.5. Detecção de <i>T. maritimum</i> por PCR.....	47
4. Discussão	55
5. Conclusão e perspetivas futuras.....	63

Referências	65
Anexos.....	75

Lista de abreviaturas

AE: Tampão de eluição do DNA (kit de extração de DNA)

AL: Tampão de lise celular (kit de extração de DNA)

anti-IgG: Anticorpo dirigido contra imunoglobulina G

anti-IgM: Anticorpo dirigido contra imunoglobulina M

ATL: Tampão de lise de tecidos (fornecido pelo kit comercial de extração de DNA)

AW2: Tampão de lavagem 2 (kit de extração de DNA)

DGAV: Direção-Geral da Alimentação e Veterinária

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FAO: Food and Agriculture Organization

FCR: Taxa de conversão alimentar

MA: Marine agar

MB: Marine broth

OD: Densidade ótica

pb: Pares de bases

PCR: Polimerase chain reaction

ppm: Partes por milhão

RNA: Ácido ribonucleico

rpm: Rotações por minuto

SGR: Índice de conversão alimentar

TAE: Tris-Acetate-EDTA

TMB: Substrato 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

T-TBS: Solução salina tamponada com Tris e Tween 20

Tween 20: Polissorbato 20

UFC/mL ou UFC mL⁻¹: Unidades formadoras de colónias por mililitro

UV: Radiação ultravioleta

Página deixada intencionalmente em branco

Lista de Figuras

Figura 1. Produção global da pesca e da aquacultura (Fonte: FAO, 2024).....	21
Figura 2. O conceito de imunonutrição na saúde preventiva (Fonte: Kiron, 2012).	28
Figura 3. Esquema do desenho experimental do ensaio de alimentação.....	33
Figura 4. Esquema do desenho experimental do momento da infeção por imersão. ...	36
Figura 5. Esquema do desenho experimental do ensaio de infeção.....	36
Figura 6. Produção de anticorpos totais no soro de juvenis, medida a 450 nm (média \pm desvio padrão) para cada tratamento	45
Figura 7. Produção de anticorpos específicos contra <i>T. maritimum</i> no soro de juvenis, medida a 450 nm (média \pm desvio padrão) para cada tratamento.....	46
Figura 8. Resultados da amplificação por PCR de diferentes primers.	47
Figura 9. Resultados da amplificação por PCR de DNA de <i>T. maritimum</i> em amostras de pele, 24 horas após o desafio.	48
Figura 10. Resultados da amplificação por PCR de DNA de <i>T. maritimum</i> em amostras de pele (B2–D3) e brânquias (A1–C2), 24 horas após o desafio.	48
Figura 11. Resultados da amplificação por PCR de DNA de <i>T. maritimum</i> em amostras de brânquias, 24 horas após o desafio.	49
Figura 12. Resultados da amplificação por PCR de DNA de <i>T. maritimum</i> em amostras de pele, 48 horas após o desafio.	50
Figura 13. Resultados da amplificação por PCR de DNA de <i>T. maritimum</i> em amostras de pele (B2–D3) e brânquias (A1–C2), 48 horas após o desafio.	50
Figura 14. Resultados da amplificação por PCR de DNA de <i>T. maritimum</i> em amostras de brânquias, 48 horas após o desafio.	51
Figura 15. Resultados da amplificação por PCR de DNA de <i>T. maritimum</i> em amostras de pele (linha superior) e brânquias (linha inferior) de peixes do grupo controlo não infetado, 24 horas após a infeção por imersão.	52
Figura 16. Resultados da amplificação por PCR de DNA de <i>T. maritimum</i> em amostras de pele (linha superior) e brânquias (linha inferior) de peixes do grupo controlo não infetado, 48 horas após a infeção por imersão.	52

Lista de Tabelas

Tabela I-Taxa de crescimento específico (SGR), índice de conversão alimentar (FCR) e peso médio inicial e final de <i>D. labrax</i> após 34 dias de ensaio de alimentação com dietas experimentais.	45
Anexos, Tabela I. <i>Humane endpoints</i>	75

Página deixada intencionalmente em branco

1.Introdução

1.1. A importância da aquacultura e os seus desafios sanitários

O desafio de alimentar uma população mundial em constante crescimento, sem comprometer os recursos naturais, revela-se cada vez mais relevante no contexto global, marcado pelo aumento da prevalência de doenças e pela insegurança alimentar. Neste cenário, a aquacultura tem-se afirmado como um setor estratégico, capaz de fornecer proteínas de elevada qualidade de forma sustentável, afirmando-se como uma alternativa viável à pesca convencional, conforme ilustrado na Figura 1 (FAO, 2024).

A limitação dos stocks de peixe selvagem, considerados recursos alimentares vitais, porém finitos, tem agravado a pressão sobre os ecossistemas, devido à exploração intensiva. A aquacultura, ao assegurar um fornecimento contínuo de pescado para consumo humano, contribui não só para a segurança alimentar global, mas também para a recuperação e sustentabilidade das populações naturais. Além disso, ao proporcionar rendimentos estáveis ao longo do ciclo produtivo, este setor cria uma margem de resiliência que favorece a regeneração e a preservação dos ecossistemas marinhos (Vaz, 2022).

Contudo, a tendência para a intensificação da produção, de modo a responder à procura crescente, acarreta igualmente riscos associados à saúde animal, em especial ao aumento da vulnerabilidade a surtos de doenças. A introdução e o transporte de stocks de peixes entre instalações aquícolas, bem como as elevadas densidades populacionais típicas dos sistemas de aquacultura, favorecem a disseminação e a proliferação de agentes patogénicos (Ferreira et al., 2023).

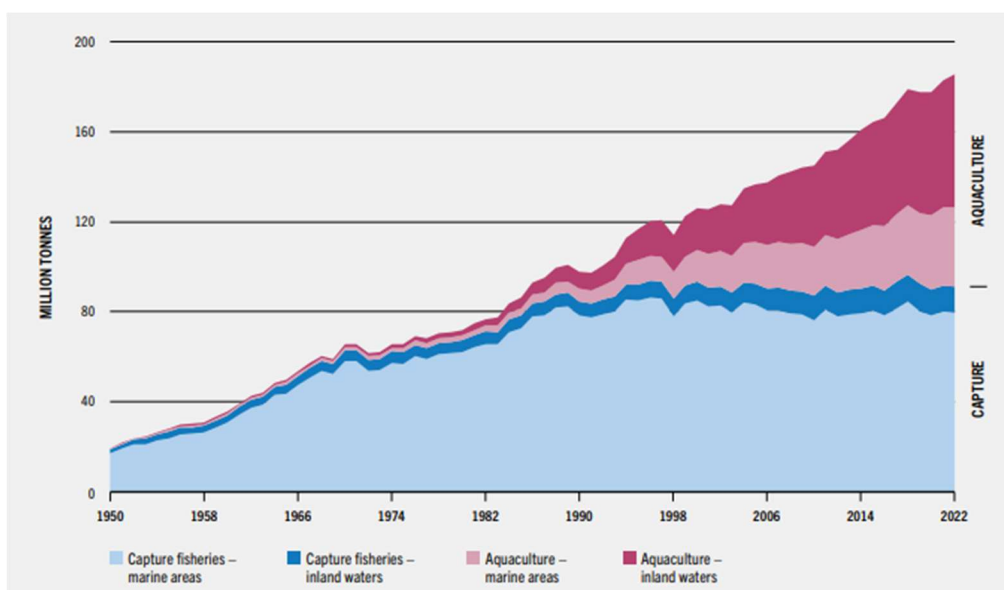


Figura 1. Produção global da pesca e da aquicultura (Fonte: FAO, 2024).

Entre as espécies cultivadas, o robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*) destaca-se atualmente como a espécie de maior valor económico na região mediterrânica, assumindo grande importância socioeconómica e comercial (Rainha, 2018). Em 2020, esta espécie representou 2,9% da produção global de peixes de aquicultura marinha e costeira, com um total de 243,9 mil toneladas, das quais 81,4 mil toneladas foram produzidas na Europa (Vieira et al., 2023).

Contudo, a produção de robalo-europeu tem sido condicionada por surtos de doenças bacterianas causadas por bactérias Gram-negativas, incluindo *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Phdp), *Aeromonas veronii*, *Pseudomonas* spp. e, de forma destacada, *Tenacibaculum maritimum* (Ferreira et al., 2023; Machado et al., 2024; Smyrli et al., 2022; Tawfeek et al., 2024). Estes agentes patogénicos estão frequentemente associados a elevadas mortalidades e a perdas económicas significativas (Sánchez et al., 2022).

Nos peixes, à semelhança dos restantes vertebrados, o sistema imunitário é constituído por dois subsistemas principais: o sistema imunitário inato e o sistema imunitário adaptativo (Kordon et al., 2021). O sistema imunitário inato constitui a primeira linha de defesa contra infeções, sendo responsável por uma resposta rápida e inespecífica, sem capacidade de memória imunológica. Os seus mecanismos incluem

barreiras físicas, como o epitélio cutâneo, o muco e as mucosas dos sistemas respiratório e digestivo; componentes celulares, nomeadamente células fagocíticas como macrófagos e neutrófilos; e mecanismos humorais, como proteínas solúveis de atividade antimicrobiana, incluindo lisozimas e lectinas. Nos peixes, as primeiras linhas de defesa incluem estruturas físicas que impedem a entrada de agentes patogénicos, tais como a pele (escamas e muco), as brânquias e o epitélio gastrointestinal. A pele, por estar em contacto direto com o meio aquático, constantemente repleto de microrganismos potencialmente patogénicos, desempenha um papel fundamental na prevenção da colonização e invasão por patógenos. Quando estas barreiras iniciais se revelam insuficientes, é ativado o sistema imunitário adaptativo, caracterizado pela elevada especificidade antigénica e pela capacidade de memória imunológica, conferindo proteção a longo prazo contra reinfeções pelo mesmo agente (Smith et al., 2019).

As interações que conduzem à ocorrência de doenças bacterianas em peixes resultam de múltiplos fatores, incluindo a presença de agentes patogénicos, a qualidade do ambiente e o estado geral de saúde dos organismos. A implementação de práticas de gestão sanitária eficientes, a vacinação sistemática e eficaz, bem como a manutenção de elevados padrões de higiene nas instalações de produção, constituem os métodos preventivos mais eficazes para reduzir o risco de surtos. Além disso, a promoção da saúde animal depende da qualidade da água, da adequada otimização das densidades de cultivo e da disponibilização de uma alimentação nutricionalmente equilibrada (Arthur et al., 2000; Le Breton, 2009).

1.2. *Tenacibaculum maritimum*: agente etiológico da tenacibaculose marinha

Tenacibaculum maritimum (Suzuki, Nakagawa, Harayama & Yamamoto 2001) é uma bactéria anteriormente designada como *Flexibacter maritimus* (Wakabayashi et al., 1986) e também identificada como *Cytophaga marina* (NCMB 2153) (Holmes, 1992), que pertence à família Flavobacteriaceae. A análise filogenética baseada no gene da subunidade B da DNA girase (*gyrB*) e no gene 16S rRNA confirmou a sua inserção no género *Tenacibaculum* (Suzuki et al., 2001).

A tenacibaculose marinha, ou flexibacteriose marinha, causada por *T. maritimum*, é uma das doenças bacterianas mais relevantes em aquacultura, responsável por surtos que afetam diversas espécies de peixes cultivados globalmente. Esta bactéria é Gram-negativa, aeróbica, filamentosa e móvel por deslizamento, tendo a capacidade de aderir e formar biofilmes intensos sobre as superfícies do hospedeiro (Escribano et al., 2023). Apresenta crescimento ótimo entre 15 °C e 34 °C, sendo a salinidade mínima para o seu desenvolvimento 30ppt, o que não impede a sua multiplicação na ausência de sais marinhos (López et al., 2009; Wakabayashi et al., 1986). A temperatura da água é um dos principais fatores na modulação da patogenicidade deste agente (Santos et al., 1999).

A virulência, conforme definida por Casadevall e Pirofski (1999), refere-se à capacidade relativa de uma bactéria resistir à resposta imunológica do hospedeiro e multiplicar-se, levando ao desenvolvimento da doença. A adesão é um pré-requisito essencial para a colonização do hospedeiro: o próprio nome do género, *Tenacibaculum* (“tenax” = manter-se firme; “baculum” = bastão), reflete essa característica. De acordo com Suzuki et al. (2001), as espécies de *Tenacibaculum* são bactérias em forma de bastonete que aderem à superfície de organismos marinhos. A adesão pode ocorrer de forma específica por ligação de compostos bacterianos a recetores do hospedeiro, ou de modo não específico, por interações hidrofóbicas ou iónicas entre a superfície bacteriana e o substrato (Ofek & Doyle, 1994, 2012). Esses mecanismos facilitam a expansão microbiana nos tecidos do hospedeiro e aumentam a dispersão de toxinas.

A infecção manifesta-se principalmente em peixes ósseos, com lesões cutâneas erosivas e úlceras localizadas na pele, barbatanas e cavidade oral, que podem evoluir para infecções sistêmicas em condições adversas. Na superfície dos peixes infetados, particularmente na cabeça, pele ou barbatanas, *T. maritimum* provoca pequenas lesões, manchas salientes, perda de escamas e desintegração parcial da epiderme. Estas lesões, geralmente, apresentam áreas de erosão revestidas por densos tapetes de bactérias filamentosas aderentes, que podem alcançar o tecido conjuntivo subjacente (Escribano et al., 2023). Além das eventuais lesões nas brânquias, as lesões extensas constituem portas de entrada para microrganismos oportunistas, originando infecções secundárias. Esta patologia é responsável por perdas económicas significativas a nível mundial, devido às taxas de mortalidade e aos sintomas clínicos associados à tenacibaculose (Bernardet et al., 1994; Ferreira et al., 2024).

Os sintomas iniciais manifestam-se como manchas pálidas na pele, de margens amareladas, que rapidamente evoluem para lesões necróticas. Ao microscópio, observam-se bastonetes finos, Gram-negativos, dispostos paralelamente às áreas com lesões, o que corrobora a natureza patogénica da bactéria (Bernardet et al., 1994).

Espécies importantes como o robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*), o salmão-do-atlântico (*Salmo salar*) e o salmão-prateado (*Oncorhynchus kisutch*) encontram-se entre as mais afetadas, registando-se elevadas taxas de mortalidade e perdas económicas significativas (Brosnahan et al., 2019). Assim, a tenacibaculose tem um impacto global relevante para a indústria da aquacultura marinha.

A patologia foi descrita pela primeira vez por Masumura & Wakabayashi (1977) como a causa de mortalidade elevada em duas espécies da família Sparidae (*Acanthopagrus schlegeli* e *Pagrus major*), após uma epizootia maciça numa maternidade de Hiroshima, no Japão. Nos anos seguintes, outras espécies cultivadas no país, como o seriola (*Seriola quinqueradiata*) e a falso-alabote-japonês (*Paralichthys olivaceus*), também foram afetadas pela doença (Baxa et al., 1986; Wakabayashi et al., 1986). Na Europa, a doença foi inicialmente detetada em populações de robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*) cultivadas na costa mediterrânica de França (Bernardet et al., 1994; Pépin & Emery, 1993). Desde então, os surtos de tenacibaculose têm sido documentados em Espanha e Portugal, principalmente em pregado (*Scophthalmus*

maximus), salmão-do-atlântico (*Salmo salar*) e, mais recentemente, linguado-senegalês (*Solea senegalensis*), linguado comum (*Solea solea*) e em dourada (*Sparus aurata*) (Avendaño-Herrera et al., 2004a, b, 2005b; Cepeda & Santos, 2002; Devesa et al., 1989; Pazos et al., 1993).

Relatos detalhados sobre episódios patológicos causados por *Tenacibaculum maritimum* permanecem limitados. No entanto, independentemente da exploração aquícola em causa, os surtos de tenacibaculose tendem a seguir um padrão sazonal consistente ao longo dos anos, com maior incidência na primavera e verão, e ocorrência reduzida no outono e inverno (Avendaño-Herrera et al., 2008; Bernardet et al., 1994; Soltani et al., 1996; Toranzo et al., 2005; Wakabayashi et al., 1984).

A gravidade da doença resulta da interação entre fatores relacionados com o hospedeiro (como o estado da superfície cutânea), com as práticas de manejo (tais como densidade elevada e alimentação inadequada), e condições ambientais (incluindo stress e exposição excessiva à radiação ultravioleta). Em determinadas condições, *T. maritimum* pode invadir órgãos internos e provocar infeções sistémicas, indicando a presença de mecanismos de virulência bem desenvolvidos (Avendaño-Herrera et al., 2006a).

Apesar da sua importância, os mecanismos de transmissão e infeção permanecem pouco compreendidos, o que dificulta completamente compreensão do modo de transmissão e dos caminhos de infeção do patógeno. A maioria do conhecimento advém de surtos naturais, mas considera-se que a transmissão horizontal em água marinha desempenhe um papel relevante, sobretudo após a transferência de peixes de tanques de pré-engorda para gaiolas em mar aberto. Contudo, alguns estudos sugerem que a microbiota aquática natural pode inibir o crescimento e a sobrevivência de *T. maritimum*, abrindo perspectivas para novas abordagens preventivas (Avendaño-Herrera et al., 2006b).

1.3. Resposta imunitária dos peixes

Os investigadores têm explorado a forma como a modulação nutricional afeta a imunidade dos peixes procurando novas estratégias para reforçar a resistência a infeções e reduzir o impacto das doenças na aquacultura (Kiron, 2012). Neste contexto, a indústria tem investido no desenvolvimento de alimentos funcionais, ou seja, dietas

enriquecidas com ingredientes bioativos capazes de estimular os mecanismos de defesa inatos e adaptativos dos peixes.

As algas constituem um dos exemplos mais promissores. Tanto microalgas quanto macroalgas contêm substâncias bioativas com efeitos imunomoduladores, tais como pigmentos, vitaminas, minerais e polissacáridos (Jacob-Lopes et al., 2019; Silva et al., 2020). Foi demonstrado, por exemplo, que dietas enriquecidas com *spirulina* (*Arthrospira platensis*) aumentam a sobrevivência do robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*) e a resistência a infecções por *Vibrio anguillarum* (Güroy et al., 2022). Os compostos bioativos derivados de algas, que podem estimular o sistema imunitário dos peixes, devem ser considerados uma estratégia para melhorar a saúde dos peixes cultivados (Güroy et al., 2022; Messina et al., 2019). Além da spirulina, a macroalga vermelha *Gracilaria gracilis* tem sido amplamente estudada devido ao seu elevado potencial como ingrediente funcional. Em dourada (*Sparus aurata*), a sua suplementação dietética promoveu melhorias no estado de saúde e maior resistência a patógenos, reduzindo simultaneamente o stress oxidativo (Passos et al., 2021a). Em robalo-europeu (*D. labrax*), um estudo demonstrou que a inclusão de *G. gracilis* na dieta modula positivamente a microbiota intestinal, aumentando a diversidade bacteriana e estimulando populações microbianas benéficas (Gonçalves et al., 2022). Adicionalmente, foi também demonstrado que a suplementação com *G. gracilis* reforça a resposta imunitária e antioxidante, preserva a integridade intestinal e melhora parâmetros produtivos, como o crescimento e a eficiência alimentar (Passos et al., 2021b).

Além das algas, outros ingredientes funcionais têm demonstrado potencial significativo na modulação da imunidade dos peixes. Os probióticos, incluindo espécies de *Bacillus*, contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal e estimulam respostas imunitárias não específicas (Ringø et al., 2018). Os prebióticos, como mananoligossacáridos e inulina, promovem seletivamente o crescimento de bactérias benéficas, fortalecendo a barreira intestinal contra patógenos (Torrecillas et al., 2014). A combinação de probióticos e prebióticos resulta nos simbióticos, cuja ação sinérgica tem sido associada a melhorias na imunidade e no desempenho produtivo (Pohlenz & Gatlin, 2014). Os β -glucanos, polissacáridos derivados de leveduras e fungos, são reconhecidos

por ativar fagócitos e aumentar a resistência a infecções bacterianas e virais (Dalmo & Seljelid, 1995). A suplementação com nucleótidos tem mostrado benefícios especialmente em situações de stress e proliferação celular rápida, reforçando a resposta adaptativa (Li & Gatlin, 2006). Por fim, os extratos vegetais e óleos essenciais como os de orégãos, alho e tomilho exibem propriedades antioxidantes e antimicrobianas, contribuindo para a imunomodulação e redução da suscetibilidade a doenças (Chakraborty et al., 2014).

A manutenção da saúde em aquacultura depende de múltiplos fatores, como qualidade da água, densidade de cultivo e gestão sanitária adequada (Arthur et al., 2000). O sistema imunitário dos teleósteos é bem desenvolvido, permitindo uma defesa eficaz contra condições adversas nos ambientes aquícolas, como o stress ou invasão por patógenos (Figura 2). Nessas circunstâncias, os peixes ativam respostas de defesa que incluem proteínas de fase aguda, sistemas antioxidantes, citocinas reguladoras e mecanismos celulares, os quais se ativam em resposta ao stress ou infecção e se desativam assim que a ameaça é neutralizada. A imunonutrição visa fornecer nutrientes ou compostos bioativos suplementares que sustentem essas respostas, aumentando a proteção geral do organismo (Oliva-Teles, 2012; Ponton et al., 2013). Esta abordagem permite incorporar propriedades imunomoduladoras com o objetivo de combater infecções e mitigar perdas associadas a doenças. As estratégias nutricionais para modular as respostas imunitárias nos peixes revelam-se promissoras, pois permitem o direcionamento de mecanismos bioquímicos específicos associados à estimulação do sistema imunitário (Pohlenz & Gatlin, 2014).

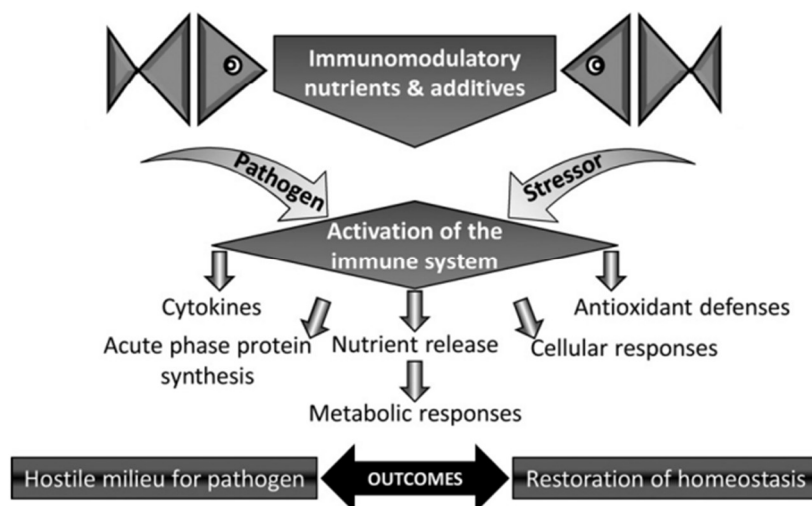


Figura 2. O conceito de imunonutrição na saúde preventiva (Fonte: Kiron, 2012).

Apesar dos avanços, o conhecimento atual sobre as respostas imunitárias dos peixes a intervenções nutricionais ainda apresenta lacunas. Grande parte da evidência disponível foca-se nos efeitos de lípidos e vitaminas C e E, permanecendo pouco explorado o papel dos macronutrientes na imunidade. Esta lacuna pode estar associada ao facto de que os alimentos compostos comerciais são geralmente formulados para exceder os requisitos mínimos de nutrientes essenciais, apresentando um elevado teor energético e uma variedade de aditivos. Paradoxalmente, o excesso de determinados micronutrientes pode causar desequilíbrios que comprometem a funcionalidade do sistema imunitário, apesar das deficiências de macronutrientes serem pouco comuns. Embora as deficiências nutricionais evidentes sejam raramente relatadas nas explorações aquícolas, deficiências subclínicas, frequentemente não diagnosticadas, podem contribuir para surtos de doenças e perdas produtivas ao longo dos ciclos de produção (Hardy, 2001).

Tradicionalmente, o controlo de surtos bacterianos em aquacultura tem-se baseado no uso de antibacterianos, como oxitetraciclina, ácido oxolínico e flumequina (Rigos & Troisi, 2005). Contudo, a utilização extensiva destes compostos levanta preocupações ambientais e quanto ao desenvolvimento de resistências antimicrobianas (Rigos et al., 2021). Neste sentido, torna-se fundamental aprofundar o conhecimento sobre alimentos funcionais e otimizar formulações dietéticas que possam reforçar a

imunidade dos peixes e reduzir a dependência de antibacterianos em sistemas de produção intensiva (Kiron, 2012).

O presente estudo tem como objetivo avaliar o desempenho do robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*) submetido a dietas experimentais, formuladas por uma empresa comercial, de modo a determinar se estas influenciam o crescimento e potenciam a resposta imunitária dos peixes quando desafiados com *Tenacibaculum maritimum* por imersão.

Página deixada intencionalmente em branco

2. Materiais e Métodos

Todos os ensaios realizados nesta dissertação obedeceram às diretrizes éticas previstas na Diretiva Europeia 2010/63/UE relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos, e foram realizados sob a supervisão de um investigador acreditado em Ciências de Animais de Laboratório pela Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV).

Foram utilizados 256 juvenis de robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*), sem histórico de tenacibaculose e com peso médio de $8 \pm 1,53$ g provenientes de uma piscicultura comercial localizada no sul de Portugal. Os peixes foram transportados para as instalações experimentais do edifício do CETEMARES - Centro de I&D, Formação e Divulgação do Conhecimento Marítimo, localizado em Peniche, Portugal. Após a sua chegada, os peixes foram mantidos em quarentena no laboratório de aquacultura, em tanques cilíndricos, com uma temperatura controlada de $17,25 \pm 0,15^\circ\text{C}$, até ao início do ensaio.

2.1. Detecção de Anticorpos Específicos por ELISA antes dos ensaios

Antes do início do ensaio, foram recolhidos aleatoriamente 15 peixes para colheita de sangue ($n = 15$), com o objetivo de avaliar, através do teste serológico ELISA, a presença de anticorpos específicos contra *Tenacibaculum maritimum*. Esta avaliação prévia permitiu confirmar que os animais não tinham contacto prévio com o patógeno, garantindo que todos iniciavam o ensaio com estado imunológico semelhante. A colheita de sangue foi efetuada com uma seringa de 1 mL (B-BRAUN) acoplada a uma agulha hipodérmica de 26Gx1,25mmx45/100 (FINE-JECT). O sangue foi transferido para um microtubo (Eppendorf, Germany) sem heparina, permitindo a coagulação e a obtenção do soro. As amostras foram armazenadas no frigorífico durante a noite para permitir a coagulação completa. No dia seguinte, o microtubo foi centrifugado a 3000g durante 7 minutos, a 4°C , para separar o soro (sobrenadante) que foi transferido para um microtubo estéril e armazenado a -80°C até à sua utilização.

A presença de IgM específicos contra *Tenacibaculum maritimum* no soro dos peixes foi avaliada utilizando o protocolo ELISA apresentado de seguida. Inicialmente, as placas de 96 poços (Sigma-Aldrich, EUA) foram revestidas com 100 µL do patógeno, numa concentração de $5,5 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, definida com base em estudos anteriores em robalo-europeu, e incubadas à temperatura ambiente durante 24 horas. Após este período, o líquido contendo a bactéria foi cuidadosamente removido, e as placas foram lavadas três vezes com 300 µL de tampão de lavagem T-TBS (Tris-buffered saline com 0,1% Tween 20). Em seguida, foi adicionado a cada poço 300 µL de tampão de bloqueio (5% de leite em pó magro em T-TBS [0,1% Tween 20]), com uma nova incubação de 24 horas à temperatura ambiente. Concluída a incubação, o tampão de bloqueio foi removido, e a placa foi novamente lavada com T-TBS, conforme descrito anteriormente, após cuidadosa remoção do líquido antes de cada lavagem. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de plasma, diluído 1:100 em Na₂CO₃ (50 mM), em triplicado, enquanto 100 µL do tampão (Na₂CO₃) foram utilizados como controlo negativo. As amostras foram incubadas a 25 °C durante 24 horas para permitir a ligação do antígeno à placa. Após a incubação, o líquido foi cuidadosamente removido. De imediato, foram adicionados 300 µL de tampão de bloqueio (leite magro em pó a 5% em T-TBS) a cada poço, com incubação adicional de 1 hora a 25 °C. Após esse período, o tampão de bloqueio foi retirado e as placas foram lavadas três vezes com 300 µL de T-TBS. Em seguida, adicionou-se 100 µL de anticorpo primário monoclonal anti-IgM de robalo-europeu (Aquatic Diagnostics, UK), diluído 1:100 em tampão de bloqueio, com incubação de 1 hora a 25 °C. Terminada a incubação, o anticorpo primário foi removido, seguida de três lavagens consecutivas com T-TBS. Posteriormente, adicionou-se o anticorpo secundário (anticorpo de rato anti-IgG conjugado com *Horseradish* Peroxidase, HRP) (Aquatic Diagnostics, UK), diluído 1:1000 em tampão de bloqueio, com incubação adicional de 1 hora a 25 °C. A placa foi lavada três vezes conforme procedimento descrito anteriormente. Por fim, adicionaram-se 100 µL de solução de substrato 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) (BioLegend) a cada poço, com incubação de 5 minutos, seguida da interrupção da reação pela adição de 100 µL de ácido sulfúrico 2 M. A densidade ótica foi medida a 450 nm utilizando um leitor de microplacas Synergy HT (Biotek, SynergyHT).

2.2. Ensaio de alimentação

O ensaio foi realizado em 4 sistemas de recirculação independentes, cada um composto por 4 aquários de 60 litros. Cada aquário continha 16 peixes, com peso inicial médio de $8 \pm 1,53$ g, totalizando 64 peixes por sistema e 256 peixes no total. Os sistemas foram identificados pelas letras A, B, C e D, conforme ilustrado na Figura 3. Os tratamentos efetuados foram:

- Tratamento A (dieta controlo).
- Tratamento B (dieta 1).
- Tratamento C (dieta 2).
- Tratamento D (dieta 3).

As dietas experimentais utilizadas neste ensaio foram desenvolvidas por uma empresa comercial especificamente para este estudo, sendo a sua composição confidencial e desconhecida para os envolvidos no ensaio. O protocolo do ensaio, foi realizado de acordo com as recomendações fornecidas pela empresa.

Antes do início do ensaio alimentar, todos os peixes foram individualmente anestesiados com 0,5 mL/L de 2-fenoxietanol (VWR Chemicals, Portugal). O peso dos peixes foi obtido com a utilização de uma balança analítica (Sartorius, Alemanha). Após a distribuição dos peixes nos aquários dos diferentes sistemas, foi realizado um período de aclimação de 7 dias. Em seguida, iniciou-se a alimentação, que decorreu por 34 dias antes do desafio de infeção.

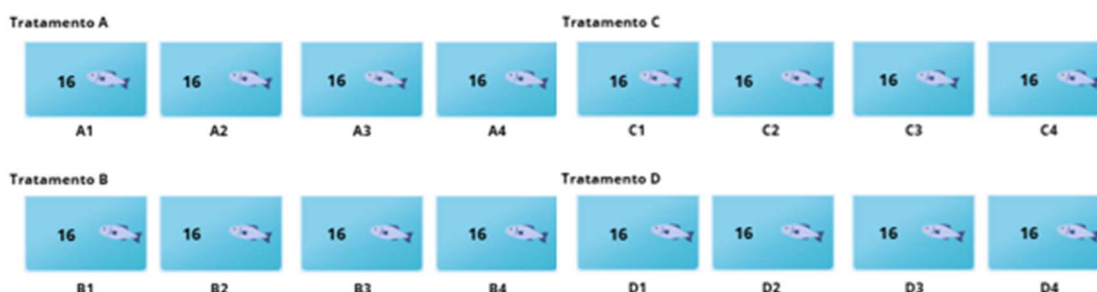


Figura 3. Esquema do desenho experimental do ensaio de alimentação.

Os parâmetros da água incluindo temperatura, oxigénio dissolvido e pH, foram monitorizados diariamente, enquanto os níveis de amónia foram avaliados duas vezes

por semana. A temperatura, o pH, a salinidade e o oxigénio dissolvido foram medidos utilizando uma sonda multiparamétrica Professional Plus (YSI, EUA), e os níveis de amónia foram determinados com o kit de teste Tropic Marin. Durante o ensaio de alimentação, os valores médios registados foram: temperatura de $16,5 \pm 0,43^{\circ}\text{C}$; pH de $8,3 \pm 0,07$; salinidade de $34,7 \pm 0,85$; oxigénio dissolvido de $7,8 \pm 0,11$ mg/L, correspondente a 98,1 %; e concentração média de amónia com um valor médio de $0,1 \pm 0,16$ mg/L. Para garantir a qualidade da água, os tanques foram sifonados diariamente para remoção de restos de alimento não consumidos e fezes. Todos os parâmetros monitorizados, incluindo a quantidade de ração fornecida, a qualidade da água e a mortalidade, foram registados numa ficha de controlo específica do ensaio. A quantidade de ração foi previamente calculada com base numa tabela de alimentação, considerando a biomassa e a temperatura da água. Durante o ensaio, o comportamento dos peixes foi também observado e documentado, registando-se quaisquer alterações.

Os peixes foram alimentados duas vezes por dia (manhã e tarde), até à saciedade, não excedendo o limite percentual indicado na tabela de alimentação.

Após o período de alimentação, os peixes foram novamente anestesiados com 0,5 mL/L de 2-fenoxietanol (VWR Chemicals, Portugal) e pesados individualmente uma balança analítica (Sartorius, Alemanha), antes de serem transportados para a sala de contenção. Foram calculados, o índice de conversão alimentar (FCR) e a taxa de crescimento específico (SGR), utilizando as seguintes equações:

$$FCR = \frac{\textit{Quantidade de ração consumida}}{\textit{Ganho de peso}}$$

$$SGR = \frac{\ln(\textit{peso final}) - \ln(\textit{peso inicial})}{\textit{número de dias}} \times 100$$

2.3. Infecção por imersão

A bactéria *Tenacibaculum maritimum* (estirpe A155, isolada de linguado-senegalês (*Solea senegalensis*)) foi conservada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até à sua utilização. Após descongelação, $100\text{ }\mu\text{L}$ da suspensão bacteriana foram cultivados em placas de *Marine Agar* (MA) incubadas a $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. Para a preparar o inóculo, 50 mL de *Marine Broth* (MB) foram inoculados com as bactérias cultivadas e transferidos para frascos Erlenmeyer de 500 mL , incubados a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação contínua (180 rpm) durante 72 horas. A turbidez da cultura foi medida a 600 nm , e as bactérias em fase exponencial de crescimento ($\text{OD} = 0,613$, correspondente a $1,62 \times 10^8\text{ UFC mL}^{-1}$) foram recolhidas por centrifugação a $3000 \times g$ durante 10 minutos. O *pellet* obtido foi ressuspenso em MB estéril, ajustando-se a suspensão a uma concentração final de $5,5 \times 10^6\text{ UFC mL}^{-1}$, com base na curva de crescimento estabelecida: $y = 2 \times 10^8 x + 4 \times 10^7$ (Ferreira et al., 2024). Todos os procedimentos foram realizados em condições de assépsia, numa câmara de fluxo laminar (Telstar Bio II Advance Plus).

Após o período de alimentação, os peixes foram transferidos para a sala de contenção, onde foram distribuídos para 8 baldes contendo água salgada, de acordo com os diferentes tratamentos (Figura 4). No momento da infecção por imersão, foram utilizados 4 baldes para os peixes serem expostos ao patógeno *Tenacibaculum maritimum*. Cada balde continha 48 peixes provenientes de três aquários de cada tratamento (A1+A2+A3; B1+B2+B3; C1+C2+C3; D1+D2+D3), num total de 192 peixes expostos ao desafio, com uma dose de *T. maritimum* de $5,5 \times 10^6\text{ UFC mL}^{-1}$ e densidade de 25 kg/m^3 . A concentração aplicada foi definida com base em estudos anteriores em robalo-europeu, nos quais Ferreira et al. (2023) utilizaram $5 \times 10^5\text{ UFC mL}^{-1}/2\text{ h}$ e Carvalho et al. (2025) testaram $1 \times 10^6\text{ UFC mL}^{-1}/2\text{ h}$. Os outros 4 baldes continham os peixes de controlo, não expostos ao patógeno, correspondentes ao quarto aquário de cada tratamento (A4, B4, C4, D4), tendo sido adicionado o mesmo volume de PBS estando sujeitos às mesmas condições que os restantes peixes, durante 2 horas. O desafio por imersão teve a duração de 2 horas, após um jejum prévio de 24 horas, com a temperatura da água a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para assegurar níveis adequados de oxigénio dissolvido, foi mantido arejamento forte durante todo o procedimento.

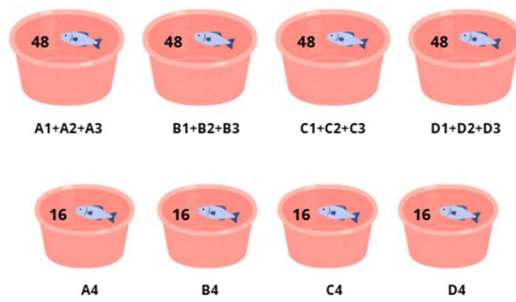


Figura 4. Esquema do desenho experimental do momento da infecção por imersão.

Concluído o período de imersão, os peixes foram transferidos para 8 sistemas de recirculação independentes: dos quais 4 eram compostos por aquários simples e 4 constituídos por aquários compartimentados, cada um dividido em 3 secções, conforme ilustrado na Figura 5.

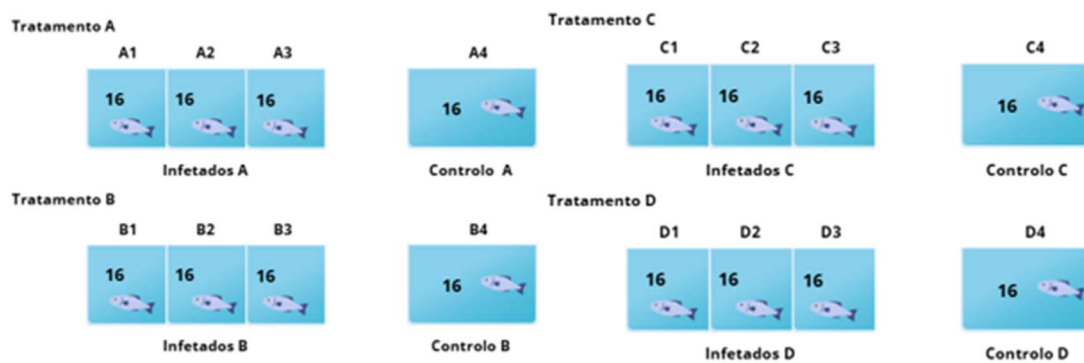


Figura 5. Esquema do desenho experimental do ensaio de infecção.

O ensaio de infecção teve a duração de 8 dias, durante os quais os peixes foram alimentados 2 vezes por dia, com as dietas atribuídas a cada tratamento. Após a primeira refeição diária, foi realizada uma sifonagem em cada tanque, para a remoção de resíduos de alimento não ingerido e material fecal, contribuindo para a manutenção da qualidade da água. A mortalidade foi registada diariamente. Adicionalmente, o comportamento dos peixes foi observado e registado, assim como a eventual manifestação de sinais clínicos associados à doença. Os parâmetros da água (temperatura, oxigénio dissolvido, pH e níveis de amónia) foram monitorizados diariamente, enquanto os níveis de nitritos foram apenas medidos no caso da concentração de amónia ultrapassasse o valor de 1 ppm. Para a medição da temperatura e do oxigénio dissolvido na água, foi utilizada

uma sonda multiparamétrica (Oxyguard, Dinamarca). A salinidade foi avaliada com um refratómetro para água salgada H196822 (Hanna Instruments, Portugal). Os níveis de amónia e nitritos foram determinados com o kit de testes Tropic Marin e Red Sea, respetivamente. Durante esta parte do ensaio, os valores médios registados foram de $25,0 \pm 0,89^\circ\text{C}$ para a temperatura, $34,7 \pm 0,73$ para a salinidade e $6,6 \pm 0,13$ mg/L (95,7 %) para o oxigénio dissolvido, a concentração média de amónia registada teve um valor médio de $0,1 \pm 0,21$ mg/L.

A análise comportamental foi realizada diariamente, em paralelo com a monitorização de potenciais sinais clínicos associados à infeção. Esta avaliação baseou-se na tabela de *Humane Endpoints* (Anexos, Tabela I), definida previamente para minimizar o sofrimento dos indivíduos caso se verificassem manifestações clínicas.

Foram recolhidas amostras de pele da região epaxial, localizada posteriormente à cabeça, e de brânquias, provenientes de 3 peixes do grupo controlo (n= 24) e de 2 peixes de cada réplica do grupo infetado (n=48), às 24 e 48 horas após a infeção por imersão, com o objetivo de detetar DNA bacteriano por PCR. Adicionalmente, foram recolhidas amostras de sangue apenas no final do ensaio (após 8 dias) para determinação de anticorpos totais e específicos através do teste ELISA. No final do ensaio, todos os peixes foram eutanasiados por administração de uma sobredose de anestésico (1 mL/L de 2-fenoxietanol) (VWR Chemicals, Portugal), em conformidade com as boas práticas de bem-estar animal. Todas as amostras foram armazenadas a -20°C até à sua utilização.

2.4. Deteção de Anticorpos Totais e Específicos por ELISA após o ensaio de infeção

Após o término do ensaio, foi realizada a colheita de sangue (n = 184). A recolha do sangue foi efetuada com uma seringa de 1 mL (B-BRAUN) acoplada a uma agulha hipodérmica de 26Gx1,25mmx45/100 (FINE-JECT), sendo o sangue recolhido para dois microtubos sem heparina, permitindo a coagulação. Foram realizados duas pools: uma composta pelos peixes controlo (CA, CB, CC e CD) e outra pelos peixes infetados no final do ensaio de alimentação (IA, IB, IC e ID). Esta divisão em pools resultou da necessidade

de agrupar amostras para obter volume de soro suficiente para análise, pois devido ao reduzido tamanho dos indivíduos a quantidade de sangue recolhida foi limitada. As amostras de sangue foram mantidas no frigorífico durante a noite para permitir a coagulação. No dia seguinte, os microtubos foram centrifugados a 3000 g, durante 7 minutos, a 4 °C, para separar do soro (sobrenadante). O soro foi transferido para microtubos estéreis e armazenado a -80 °C até à realização do ensaio ELISA.

2.4.1. Deteção de Anticorpos Totais

A quantificação de IgM total no soro de peixes infetados foi realizada utilizando o protocolo ELISA. Amostras de soro (100 µL), diluídas 1:100 em Na₂CO₃ (50 mM), foram adicionadas em triplicado numa placa de 96 poços. Para o controlo negativo, foram adicionados 100 µL de tampão (Na₂CO₃) nos poços designados. As amostras de soro (antigénios) foram incubadas a 25 °C durante 1 hora para promover a adesão à placa revestida com antigénios, sendo o líquido posteriormente removido. Após esta incubação, adicionaram-se 300 µL de tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em T-TBS com 0,1% Tween 20) a cada poço, com incubação durante 1 hora a 25 °C. Após remoção do tampão de bloqueio, as placas foram lavadas três vezes com 300 µL de T-TBS. Após a lavagem, foram adicionados 100 µL de anticorpo monoclonal primário anti-IgM de robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*) (Aquatic Diagnostics, UK), diluído 1:100 em tampão de bloqueio, e incubou-se durante 1 hora a 25 °C. Após a remoção do anticorpo primário, realizaram-se três lavagens adicionais, conforme descrito anteriormente. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de anticorpo secundário conjugado (anti-IgG de rato-HRP), diluído 1:1000 em tampão de bloqueio, e incubou-se durante 1 hora a 25 °C. A placa foi então lavada três vezes. Por fim, adicionaram-se 100 µL da solução substrato TMB para ELISA (BioLegend) a cada poço, com incubação durante 5 minutos. A reação de desenvolvimento foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido sulfúrico 2 M, e a densidade ótica foi medida a 450 nm utilizando o leitor de microplacas Synergy HT (BioTek, SynergyHT).

2.4.2. Deteção de Anticorpos Específicos

Para a deteção de anticorpos específicos, foi utilizado o método ELISA, conforme descrito detalhadamente no protocolo apresentado na secção 2.1.

2.5. Seleção e validação dos *primers*

De modo, a selecionar o par de *primers* mais adequado à estirpe A155 de *T. maritimum* (isolada de *Solea senegalensis*), foram selecionados cinco pares de *primers* com base em artigos científicos previamente publicados. O desempenho de cada par foi testado por PCR convencional seguido de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Os pares testados foram: (S1- MAR1_Toyama et al. (1996)_T-maritimum: 5'- AAT GGC ATC GTT TTA AA -3'; MAR2: 5'- CGC TCT CTG TTG CCA GA -3'); (S2-mar1_Bader & Shotts (1998): 5'-TGTAGCTTGCTACAGATGA-3'; mar2: 5'-AAATACCTACTCGTAGGTACG-3'); (S3-MAR3_Fringuelli et al. (2012): 5'- GAT GAA CGC TAG CGG CAG GC -3'; MAR6: 5'- CCG TAG GAG TCT GGT CCG TG - 3'); (S4-MAR4_Fringuelli et al.(2012): 5'- TGC CTT CTA CAG AGG GAT AGC C -3'; MAR: 5'- CTA TCG TTG CCA TGG TAA GCC G -3') e (S5-Tm-rRNA16S-FW: 5'- CTT TGG AAT GGC ATC GTT TT -3'; Tm-rRNA16S-RV: 5'- CGT AGG AGT CTG GTC CGT GT -3').

As reações foram preparadas com NZYtaq II 2× Green Master Mix (NZYTech), num volume final de 20 µL, contendo 1× Master Mix, 0,5 µL de cada *primer*, 1 µL de DNA (≈30 ng) e 8 µL de água ultrapura (Milli-Q). Para cada par de *primers*, incluíram-se um controlo negativo e um controlo positivo. O controlo negativo consistiu na substituição do DNA por água ultrapura (Milli-Q), de forma a garantir a ausência de contaminação nos reagentes. O controlo positivo consistiu em DNA purificado da estirpe *T. maritimum* A155, isolada de linguado-senegalês (*Solea senegalensis*).

Os perfis térmicos das reações de amplificação foram ajustados para cada grupo de *primers*: para os pares de *primers* (S2/S3/S5), realizou-se uma desnaturação inicial a 94 °C durante 3 minutos; seguida de 30 ciclos com desnaturação a 94 °C durante 30 segundos, *annealing* a 60/58°C durante 45 segundos e extensão a 72 °C durante 1 minuto; finalizando com uma extensão final a 72 °C durante 5 minutos. Para os pares de *primers* (S1 e S4), o ciclo térmico consistiu em desnaturação inicial a 94 °C durante 3 minutos; seguida de 30 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 segundos, *annealing* a 45/52°C durante 45 segundos e extensão a 72 °C durante 1 minuto; seguidos de uma extensão final a 72 °C durante 5 minutos.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, preparado em tampão TAE 1× e corado com brometo de etídio. A identificação dos fragmentos amplificados foi feita por comparação com um marcador de peso molecular (DNA Ladder V, NZYTech), esperando-se um produto aproximadamente 400 pares de bases (pb).

2.6. Extração de DNA

A extração de DNA a partir de tecido foi realizada utilizando o kit comercial *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo um protocolo ligeiramente modificado para eliminar RNA residual e garantir DNA de elevada pureza. Após extração, o DNA foi sujeito a uma etapa adicional de purificação e concentração por precipitação com etanol absoluto e acetato de sódio 3 M (pH 5,2), com incubação a -20°C durante a noite.

Inicialmente, foram transferidos 180 μL de tampão de lise de tecidos (ATL) para microtubos de 1,5 mL (ou 360 μL para amostras de maior volume). Tecido até 25 mg foi pesado e adicionado ao tubo contendo o tampão ATL. Foram adicionados 20 μL de proteínase K (ou 40 μL quando se utilizou 360 μL de ATL), e a mistura foi homogeneizada por vortex. Posteriormente, as amostras foram incubadas num termobloco (VWR, Portugal) a 56°C , com agitação constante a 700 rpm, durante algumas horas ou durante a noite, até se observar lise completa do tecido. Após a lise, as amostras foram deixadas arrefecer à temperatura ambiente, seguidas da adição de 4 μL de RNase A (solução de stock a 100 mg/ μL), ou 8 μL para maiores volumes, de ATL com nova homogeneização e incubação à temperatura ambiente durante 5 minutos para digestão do RNA. Posteriormente, foram adicionados 200 μL de tampão AL (ou 400 μL , consoante o volume de ATL), seguido de homogeneização vigorosa por vortex, seguida da adição de 200 μL de etanol absoluto (96–100%) e nova homogeneização. Toda a mistura, incluindo eventuais precipitados, foi transferida para a coluna de centrifugação (*DNeasy Mini Spin Column*), que foi centrifugada a $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) durante 1 minuto. O tubo de recolha e o eluído foram descartados, e a coluna foi transferida para um novo tubo. Foram adicionados 500 μL do tampão de lavagem AW1, e efetuou-se centrifugação sob as mesmas condições. Essa etapa foi repetida com 500 μL do tampão AW2, seguida de centrifugação a $20000 \times g$ (14000 rpm) durante 3 minutos. Foram tomados cuidados

adicionais para evitar o contacto do fluxo com a membrana inferior da coluna. Para a eluição do DNA, a coluna foi colocada em microtubo estéril de 1,5 mL, onde foram adicionados 50 µL do tampão AE ao centro da membrana. Seguiu-se incubação de 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugação final a $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) durante 1 minuto. O DNA eluído foi conservado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até posterior utilização.

2.6.1. Purificação adicional do DNA

Após a extração inicial, procedeu-se a uma etapa adicional de purificação visando a remoção de contaminantes residuais como proteínas, sais, fenóis ou resíduos de etanol, que poderiam interferir na qualidade do DNA. Para isso, adicionaram-se dois volumes de etanol absoluto (100 µL) e 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M (pH 5,2), correspondente a 5 µL, à amostra eluída (50 µL de tampão AE). A mistura foi homogeneizada por vortex e incubada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante a noite. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante contendo o etanol foi cuidadosamente removido, certificando-se de eliminar qualquer resíduo sem perturbar o *pellet*. Em seguida, foram adicionados 700 µL de etanol a 70%, e o tubo foi suavemente agitado para soltar o *pellet* aderido ao fundo. As amostras foram mantidas em refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) por pelo menos 2 horas, facilitando a remoção de sais residuais. Após esse período, realizou-se nova centrifugação a 13000 rpm durante 10 minutos, e o etanol foi novamente removido com cuidado. O *pellet* obtido foi seco ao ar livre ou em termobloco (VWR, Portugal) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, até à total evaporação do etanol. Após secagem, o DNA foi ressuspenso em 25 a 30 µL de tampão AE. A concentração e a pureza do DNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria (NanoDrop, Thermo Scientific), com quantificação adicional por Qubit (opcionalmente). As amostras foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até posterior utilização.

2.7. Detecção de *T. maritimum* por PCR

A concentração e pureza do DNA genómico extraído do robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*) foram avaliadas por espectrofotometria UV-vis (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Para avaliar a integridade e pureza das amostras de DNA, analisaram-se os rácios de absorvância 260/280 nm. Valores próximos de 1,8 são geralmente interpretados como indicativos de DNA relativamente puro, com baixa contaminação por

proteínas. No entanto, este rácio não permite confirmar de forma absoluta a ausência de RNA residual. A deteção de *T. maritimum* foi realizada por PCR convencional, utilizando o reagente NZYtaq II 2× Green Master Mix (NZYTech), em combinação com *primers* específicos para *T. maritimum* (mar1_Bader_Shotts: 5'-TGTAGCTTGCTACAGATGA-3'; mar2: 5'-AAATACCTACTCGTAGGTACG-3'). Cada reação de PCR foi conduzida com 30 ng de DNA genómico total.

Em cada ensaio, foram utilizados um controlo negativo e positivo: o controlo negativo foi preparado substituindo o DNA por água ultrapura (Milli-Q), para garantir a ausência de contaminação nos reagentes, enquanto o controlo positivo consistiu em DNA purificado da estirpe *T. maritimum* A155, isolada de linguado-senegalês (*Solea senegalensis*).

As reações de amplificação por PCR foram realizadas com o seguinte perfil térmico: uma desnaturação inicial a 94 °C durante 3 minutos; seguiu-se um ciclo de 35 ciclos, cada qual consistindo de desnaturação a 94 °C durante 20 segundos, *annealing* a 58 °C durante 45 segundos e extensão a 72 °C durante 1 minuto; finalizando com uma extensão prolongada a 72 °C durante 5 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, preparado em tampão TAE 1× e corado com brometo de etídio. A identificação dos fragmentos foi feita por comparação do tamanho com um marcador sólido de peso molecular (DNA Ladder V, NZYTech). Espera-se a amplificação de um fragmento com tamanho aproximado de 400 pares de bases (pb).

2.8. Análise Estatística

Os dados referentes ao índice de conversão alimentar (FCR) e à taxa de crescimento específico (SGR), obtidos para as 4 dietas experimentais, foram apresentados como médias \pm desvio-padrão. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade das variâncias foi confirmada, permitindo a aplicação de análise variância (ANOVA) unidirecional para comparação das médias entre tratamentos. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SigmaPlot (versão 12.0, Systat Software, Inc., EUA). O nível de significância adotado para as comparações foi de 5%.

Página deixada intencionalmente em branco

3. Resultados

3.1. Detecção de Anticorpos Específicos por ELISA antes dos ensaios

Os níveis de anticorpos específicos contra *T. maritimum* foram avaliados no soro de juvenis de *D. labrax* (n = 15). Os resultados revelaram valores médios de absorbância de $0,004 \pm 0,001$, indicando ausência de anticorpos específicos contra *T. maritimum* nos indivíduos analisados.

3.2. Ensaio de alimentação

Os resultados do ensaio de alimentação, com as quatro dietas fornecidas ao longo de 34 dias, evidenciaram diferenças entre os tratamentos com relação à eficiência alimentar e ao crescimento dos peixes, e encontram-se apresentados na Tabela I. Durante este período, não foi registada mortalidade em nenhum dos tratamentos.

Os exemplares do tratamento B (dieta 1) destacaram-se por apresentarem o menor índice de conversão alimentar (FCR) ($1,13 \pm 0,08$) e a maior taxa de crescimento específico (SGR) ($1,29 \pm 0,10$ %/dia), além do maior peso médio final ($13,27 \pm 0,70$ g). Em contraste, os peixes do tratamento D (dieta 3) evidenciaram o desempenho menos favorável, com o FCR mais elevado ($1,33 \pm 0,31$), o menor SGR ($1,16 \pm 0,25$ %/dia) e o menor peso médio final ($12,29 \pm 1,09$ g). Os tratamentos A (dieta controlo) e C (dieta 2) apresentaram valores intermédios semelhantes entre si, com FCR de $1,23 \pm 0,21$ e $1,24 \pm 0,13$, SGR de $1,22 \pm 0,15$ %/dia e $1,18 \pm 0,16$ %/dia, e pesos médios finais de $12,38 \pm 1,03$ g e $12,36 \pm 0,78$ g, respetivamente. Apesar desta tendência clara, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na taxa de crescimento específico (SGR) nem no índice de conversão alimentar (FCR) entre os peixes alimentados com as 4 dietas ($p > 0,05$).

Tabela I- Taxa de crescimento específico (SGR), índice de conversão alimentar (FCR) e peso médio inicial e final de *D. labrax* após 34 dias de ensaio de alimentação com dietas experimentais. Os resultados indicaram que não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Tratamento	Dieta	SGR (%/dia)	FCR	Peso médio inicial (g)	Peso médio final (g)
A	Controlo	1,22 ± 0,15	1,23 ± 0,21	8,16 ± 0,52	12,38 ± 1,03
B	1	1,29 ± 0,10	1,13 ± 0,08	8,55 ± 0,33	13,27 ± 0,70
C	2	1,18 ± 0,16	1,24 ± 0,13	8,28 ± 0,19	12,36 ± 0,78
D	3	1,16 ± 0,25	1,33 ± 0,31	8,28 ± 0,50	12,29 ± 1,09

3.3. Infeção por imersão

Ao longo do ensaio, não foram observadas alterações comportamentais nem sinais clínicos típicos da infeção por *T. maritimum*, como úlceras, necrose das barbatanas, erosões cutâneas ou letargia, não tendo sido registada qualquer mortalidade ou sinais de doença em nenhum dos grupos experimentais.

3.4. Deteção de Anticorpos Totais e Específicos por ELISA após a infeção

3.4.1. Deteção de Anticorpos Totais

Os níveis de anticorpos totais contra *Tenacibaculum maritimum* foram avaliados no soro de juvenis de *D. labrax*, após o ensaio de infeção, e os resultados obtidos estão apresentados graficamente na Figura 6, onde o eixo Y representa a densidade ótica (DO) a 450 nm.

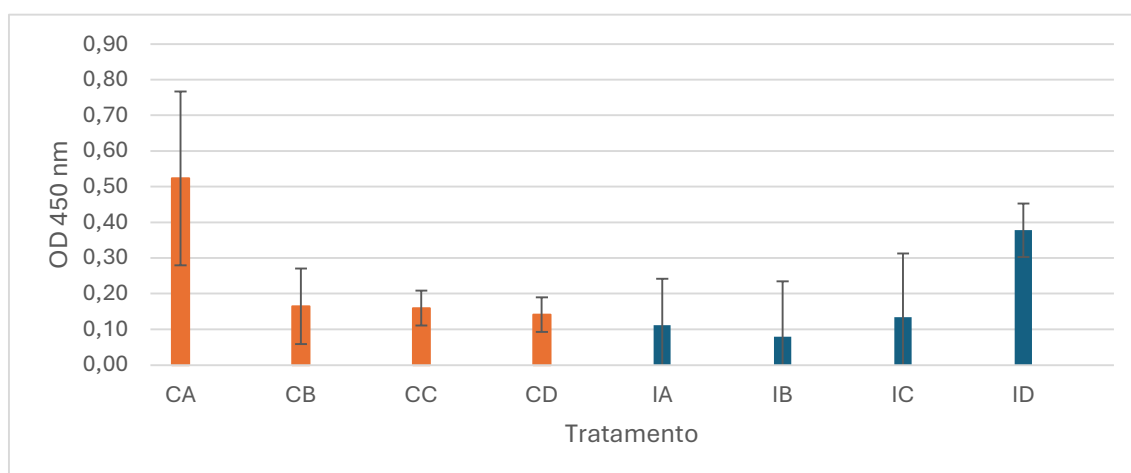


Figura 6. Produção de anticorpos totais no soro de juvenis, medida a 450 nm (média ± desvio padrão) para cada tratamento (Controlo (C): n=40; CA – Pool do tratamento A (dieta controlo); CB – Pool do tratamento B (dieta 1); CC – Pool do tratamento C (dieta 2); CD – Pool do tratamento D (dieta 3); Infetados (I): n=144; IA – Pool do tratamento A (dieta controlo); IB – Pool do tratamento B (dieta 1); IC – Pool do tratamento C (dieta 2); ID – Pool do tratamento D (dieta 3)).

A densidade ótica (DO), medida a 450 nm, variou entre os diferentes grupos experimentais. O tratamento CA apresentou o valor médio mais elevado de DO, aproximadamente, 0,75, com uma maior dispersão nos dados, refletida pelo maior desvio padrão. Os restantes grupos controlo (CB, CC e CD) exibiram valores médios significativamente inferiores, situando-se entre 0,15 e 0,25, com variações menos acentuadas. Entre os grupos infetados, o tratamento ID destacou-se pelo segundo valor médio mais elevado de DO (aproximadamente, 0,45), associado igualmente a um desvio padrão mais pronunciado, contrastando com os tratamentos IA, IB e IC, que registaram valores médios inferiores variando entre 0,20 e 0,30.

3.4.2. Deteção de Anticorpos Específicos após infeção

Os níveis de anticorpos específicos contra *T. maritimum* foram avaliados no soro de juvenis de *D. labrax*, após o ensaio de infeção, e os resultados obtidos estão apresentados graficamente na Figura 7, onde o eixo Y representa a densidade ótica (DO) a 450 nm.

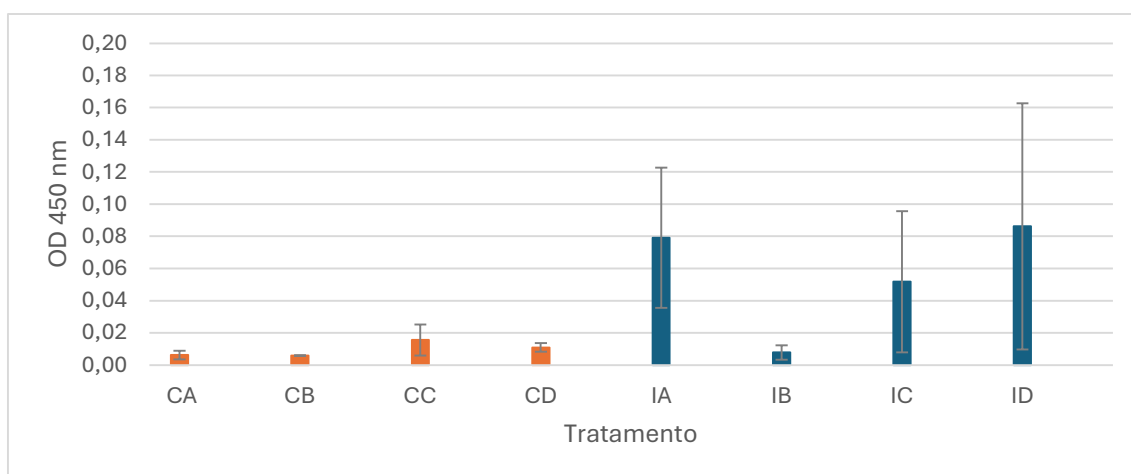


Figura 7. Produção de anticorpos específicos contra *T. maritimum* no soro de juvenis, medida a 450 nm (média ± desvio padrão) para cada tratamento (Controlo (C): n=40; CA – Pool do tratamento A (dieta controlo); CB – Pool do tratamento B (dieta 1); CC – Pool do tratamento C (dieta 2); CD – Pool do tratamento D (dieta 3); Infetados (I): n=144; IA – Pool do tratamento A (dieta controlo); IB – Pool do tratamento B (dieta 1); IC – Pool do tratamento C (dieta 2); ID – Pool do tratamento D (dieta 3)).

De modo geral, os tratamentos em que os peixes não foram expostos ao patógeno (CA, CB, CC e CD) apresentaram valores de DO próximos de zero, sugerindo a ausência de anticorpos específicos detetáveis. Entre os tratamentos infetados, o tratamento ID, evidenciou o maior valor médio de DO, com um aumento notável em relação aos restantes grupos infetados. O tratamento IB, apresentou valores de DO inferiores, próximos aos observados nos grupos de controle.

3.5. Detecção de *T. maritimum* por PCR

Os resultados obtidos na seleção e validação dos *primers*, estão apresentados graficamente na Figura 8.

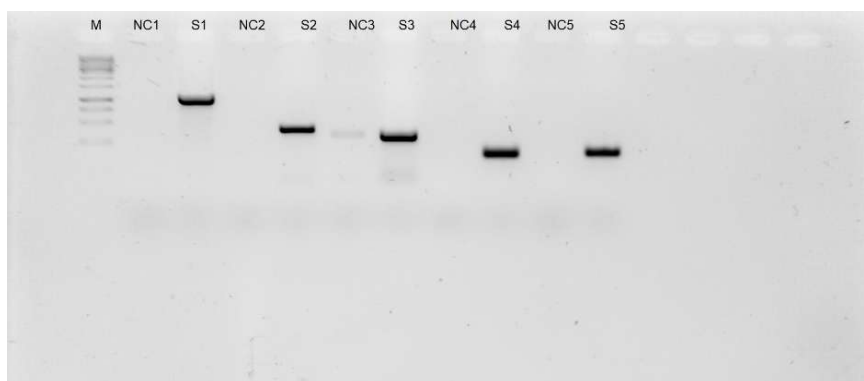


Figura 8. Resultados da amplificação por PCR de diferentes *primers*. (M- marcador de peso molecular; NC1- controlo negativo de S1; S1- MAR1/MAR2 (Toyama); NC2- controlo negativo de S2; S2- mar1/mar2 (Bader & Shotts); NC3- controlo negativo de S3; S3 – MAR3/MAR6 (Fringuelli); NC4- controlo negativo de S4; S4- MAR4/MAR (Fringuelli); NC5- controlo negativo de S5; S5- Tm-rRNA16S-FW/RV).

A seleção inicial de cinco pares de *primers* descritos na literatura permitiu avaliar a sua eficiência e especificidade na amplificação de DNA da estirpe *T. maritimum* A155. Os pares S1 (MAR1/MAR2 (Toyama)), S2 (mar1/mar2 (Bader & Shotts)), S3 (MAR3/MAR6 (Fringuelli)), S4 (MAR4/MAR (Fringuelli)) e S5 (Tm-rRNA16S-FW/RV), produziram bandas únicas e nítidas no gel de agarose a 1,5% durante a eletroforese. Os controlos negativos (NC1–NC5) apresentaram ausência de bandas detetáveis, exceto NC3, que apresentou um leve sinal.

O par de *primers* S2, foi selecionado para a fase de deteção por apresentar melhor perfil de especificidade, produzindo uma banda única com o tamanho esperado (~400 pb), ausência de produtos secundários, e com controlos negativos sem

amplificação, reduzindo o risco de falsos-positivos e aumentando a confiança na interpretação dos resultados.

Às 24 horas após o desafio bacteriano, a amplificação do DNA de *T. maritimum* foi bem-sucedida na maioria das amostras de pele e brânquias dos peixes infetados. A presença de bandas específicas, com aproximadamente 400 pares de bases, confirmou a detecção do agente patogénico. Observou-se, no entanto, uma variação acentuada na intensidade das bandas entre as amostras, sugerindo diferenças na carga bacteriana entre indivíduos. Esta variação não apresentou um padrão consistente entre os diferentes grupos experimentais, nem entre os tipos de tecido analisados (pele vs. brânquias), o que pode refletir uma infeção heterogénea ou uma colonização inicial não uniforme (Figuras 9 a 11).



Figura 9. Resultados da amplificação por PCR de DNA de *T. maritimum* em amostras de pele, 24 horas após o desafio. Todas as amostras, exceto B1P2, apresentaram resultado positivo para a presença de DNA de *T. maritimum*. M – Marcador de peso molecular (DNA ladder); N – Controlo negativo; P – Controlo positivo. ((A1, A2, A3P1) – peixe 1 alimentado com o tratamento A (dieta controlo); (A1, A2, A3P2) – peixe 2 alimentado com o tratamento A (dieta controlo); (B1, B2, B3P1) – peixe 1 alimentado com o tratamento B (dieta 1); (B1P2) – peixe 2 alimentado com o tratamento B (dieta 1); (C1, C2, C3P1) – peixe 1 alimentado com o tratamento C (dieta 2); (D1, D2, D3P1) – peixe 1 alimentado com o tratamento D (dieta 3)).

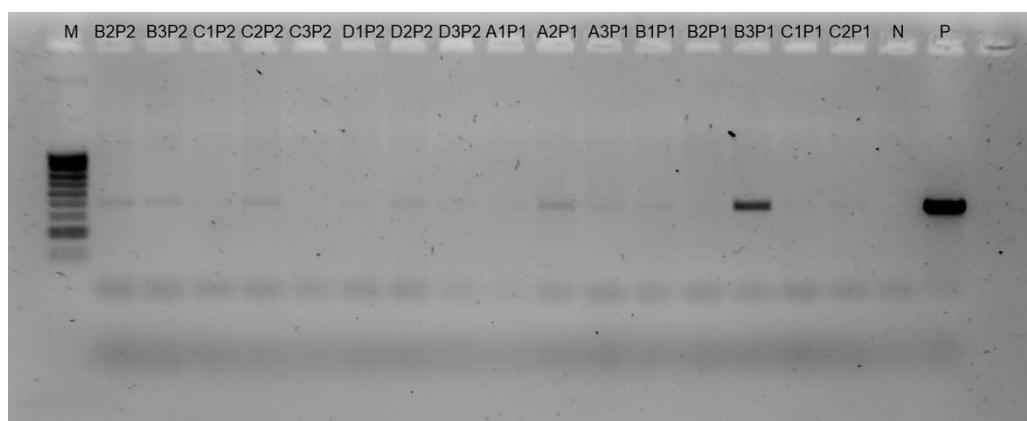


Figura 10. Resultados da amplificação por PCR de DNA de *T. maritimum* em amostras de pele (B2–D3) e brânquias (A1–C2), 24 horas após o desafio. A maioria das amostras apresentou resultado positivo para a presença de DNA de

T. maritimum, com bandas de menor intensidade. (M – Marcador de peso molecular (DNA ladder); N – Controlo negativo; P – Controlo positivo. ((A1, A2, A3P1) – peixe 1 alimentado com o tratamento A (dieta controlo); (B1, B2, B3P1) – peixe 1 alimentado com o tratamento B (dieta 1); (B2, B3P2) – peixe 2 alimentado com o tratamento B (dieta 1); (C1, C2P1) – peixe 1 alimentado com o tratamento C (dieta 2); (C1, C2, C3P2) – peixe 2 alimentado com o tratamento C (dieta 2); (D1, D2, D3P2) – peixe 2 alimentado com o tratamento D (dieta 3)).



Figura 11. Resultados da amplificação por PCR de DNA de *T. maritimum* em amostras de brânquias, 24 horas após o desafio. A maioria das amostras apresentou resultado positivo para a presença de DNA de *T. maritimum*, embora com menor intensidade de banda. M – Marcador de peso molecular (DNA ladder); N – Controlo negativo; P – Controlo positivo. ((A1, A2, A3P2) – peixe 2 alimentado com o tratamento A (dieta controlo); (B1, B2, B3P2) – peixe 2 alimentado com o tratamento B (dieta 1); (C3P1) – peixe 1 alimentado com o tratamento C (dieta 2); (C1, C2, C3P2) – peixe 2 alimentado com o tratamento C (dieta 2); (D1, D2, D3P1) – peixe 1 alimentado com o tratamento D (dieta 3); (D1, D2, D3P2) – peixe 2 alimentado com o tratamento D (dieta 3)).

Na Figura 9 observa-se que todas as amostras, com exceção de B1P2 (peixe 2 alimentado com o tratamento B (dieta 1)), evidenciaram amplificação de DNA de *T. maritimum*. Na Figura 10, a maioria das amostras apresentou bandas correspondentes ao DNA de *T. maritimum*, embora de menor intensidade, exceto a amostra de brânquias B3P1 (peixe 1 alimentado com o tratamento B (dieta 1)), na qual não foi detetada amplificação. De forma semelhante, na Figura 11 observa-se que a maioria das amostras foi positiva para DNA de *T. maritimum*, também com bandas de intensidade reduzida.

Às 48 horas após o desafio, a deteção de DNA bacteriano foi consideravelmente reduzida, sendo observadas bandas específicas apenas numa amostra de pele (D3P2) e numa de brânquias (B2P2), pertencentes a grupos experimentais diferentes (Figuras 12 a 14).

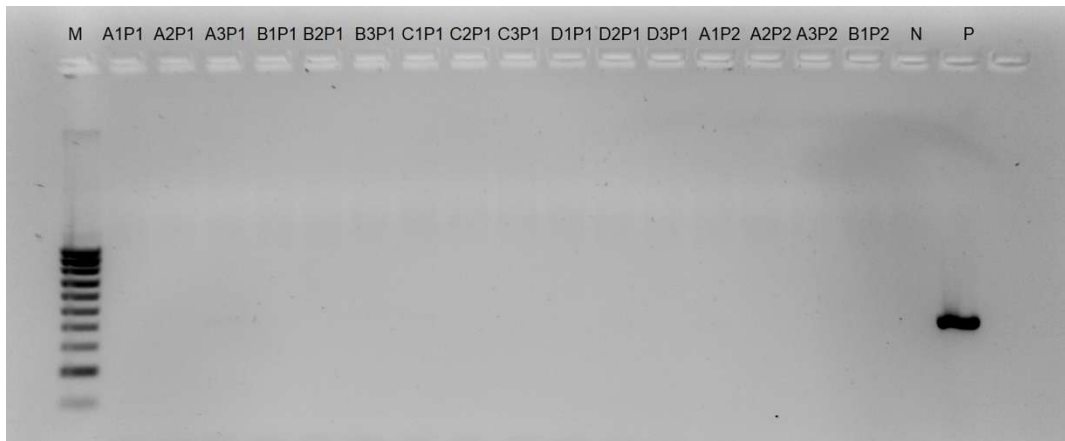


Figura 12. Resultados da amplificação por PCR de DNA de *T. maritimum* em amostras de pele, 48 horas após o desafio. Todas as amostras testaram negativo para a presença de DNA de *T. maritimum*. M – Marcador de peso molecular (DNA ladder); N – Controlo negativo; P – Controlo positivo. ((A1, A2, A3P1) – peixe 1 alimentado com o tratamento A (dieta controlo); (A1, A2, A3P2) – peixe 2 alimentado com o tratamento A (dieta controlo); (B1, B2, B3P1) – peixe 1 alimentado com o tratamento B (dieta 1); (B1P2) – peixe 2 alimentado com o tratamento B (dieta 1); (C1, C2, C3P1) – peixe 1 alimentado com o tratamento C (dieta 2); (D1, D2, D3P1) – peixe 1 alimentado com o tratamento D (dieta 3)).

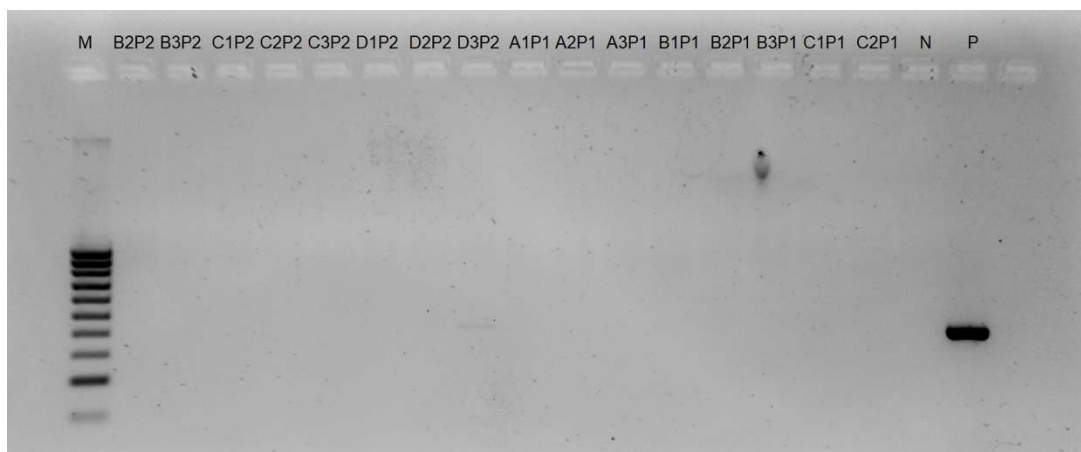


Figura 13. Resultados da amplificação por PCR de DNA de *T. maritimum* em amostras de pele (B2–D3) e brânquias (A1–C2), 48 horas após o desafio. Apenas uma amostra de pele (D3P2) testou positivo para a presença de DNA de *T. maritimum*, apresentando uma banda de fraca intensidade. M – Marcador de peso molecular (DNA ladder); N – Controlo negativo; P – Controlo positivo. ((A1, A2, A3P1) – peixe 1 alimentado com o tratamento A (dieta controlo); (B1, B2, B3P1) – peixe 1 alimentado com o tratamento B (dieta 1); (B2, B3P2) – peixe 2 alimentado com o tratamento B (dieta 1); (C1, C2P1) – peixe 1 alimentado com o tratamento C (dieta 2); (C1, C2, C3P2) – peixe 2 alimentado com o tratamento C (dieta 2); (D1, D2, D3P2) – peixe 2 alimentado com o tratamento D (dieta 3)).

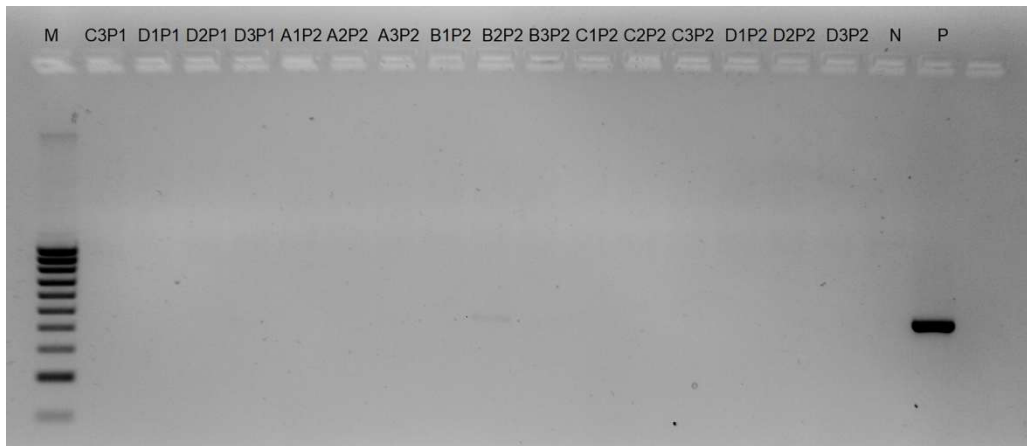


Figura 14. Resultados da amplificação por PCR de DNA de *T. maritimum* em amostras de brânquias, 48 horas após o desafio. Apenas uma amostra de brânquias (B2P2) testou positivo para a presença de DNA de *T. maritimum*, apresentando uma banda de fraca intensidade. M – Marcador de peso molecular (DNA ladder); N – Controlo negativo; P – Controlo positivo. ((A1, A2, A3P2) – peixe 2 alimentado com o tratamento A (dieta controlo); (B1, B2, B3P2) – peixe 2 alimentado com o tratamento B (dieta 1); (C3P1) – peixe 1 alimentado com o tratamento C (dieta 2); (C1, C2, C3P2) – peixe 2 alimentado com o tratamento C (dieta 2); (D1, D2, D3P1) – peixe 1 alimentado com o tratamento D (dieta 3); (D1, D2, D3P2) – peixe 2 alimentado com o tratamento D (dieta 3)).

Na Figura 12, observa-se que todas as amostras analisadas foram negativas para a presença de DNA de *T. maritimum*, evidenciando a ausência do patógeno nessas amostras. Na Figura 13, apenas a amostra de pele D3P2 (peixe 2 alimentado com o tratamento D (dieta 3)), apresentou amplificação, demonstrada por uma banda de intensidade fraca. De forma semelhante, na Figura 14 apenas a amostra de brânquias B2P2 (peixe 2 alimentado com o tratamento B (dieta 1)) evidenciou banda de baixa intensidade, confirmando a presença de DNA de *T. maritimum*.

Nas amostras provenientes dos peixes não infetados (grupo controlo negativo), não foi detetado DNA bacteriano de *T. maritimum* nas análises realizadas (Figuras 15 e 16). Estes resultados confirmam a especificidade da reação de PCR utilizada, bem como a ausência de contaminação cruzada entre as amostras durante o procedimento experimental.

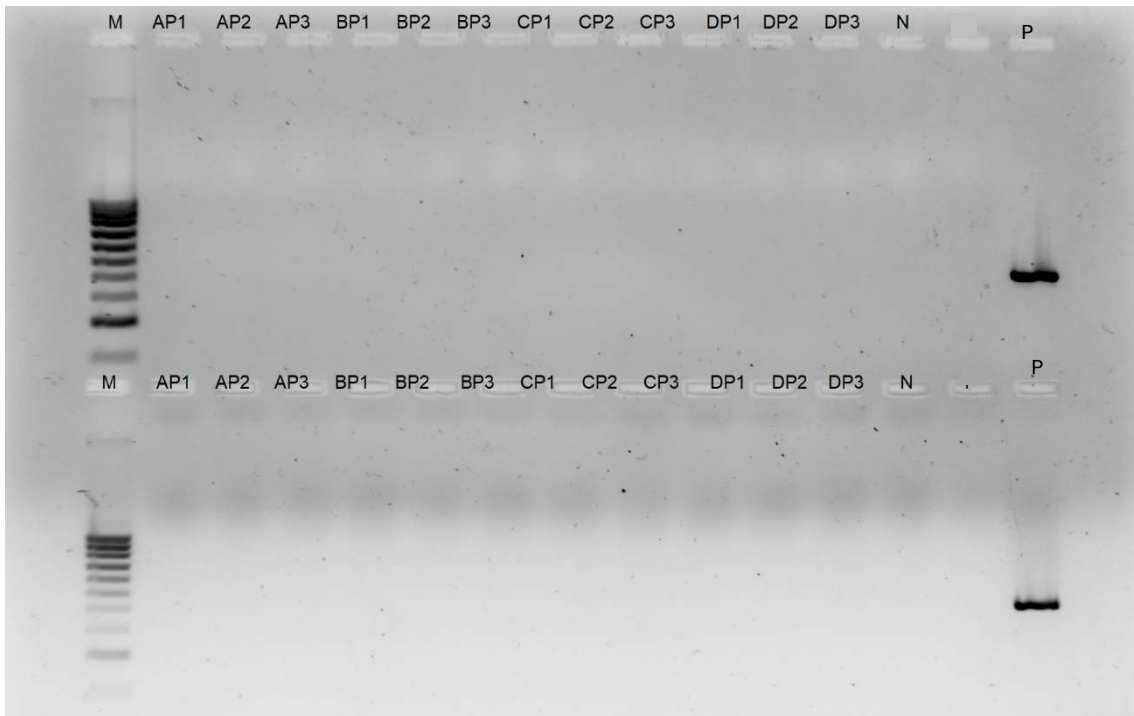


Figura 15. Resultados da amplificação por PCR de DNA de *T. maritimum* em amostras de pele (linha superior) e brânquias (linha inferior) de peixes do grupo controle não infetado, 24 horas após a infecção por imersão. Todas as amostras testaram negativas para a presença de DNA de *T. maritimum*. (M – Marcador de peso molecular (DNA ladder); N – Controle negativo; P – Controle positivo; AP1 – peixe 1 alimentado com o tratamento A (dieta controle); AP2 – peixe 2 alimentado com o tratamento A (dieta controle); AP3 – peixe 3 alimentado com o tratamento A (dieta controle); BP1 – peixe 1 alimentado com o tratamento B (dieta 1); BP2 – peixe 2 alimentado com o tratamento B (dieta 1); BP3 – peixe 3 alimentado com o tratamento B (dieta 1); CP1 – peixe 1 alimentado com o tratamento C (dieta 2); CP2 – peixe 2 alimentado com o tratamento C (dieta 2); CP3 – peixe 3 alimentado com o tratamento C (dieta 2); DP1 – peixe 1 alimentado com o tratamento D (dieta 3); DP2 – peixe 2 alimentado com o tratamento D (dieta 3); DP3 – peixe 3 alimentado com o tratamento D (dieta 3)).

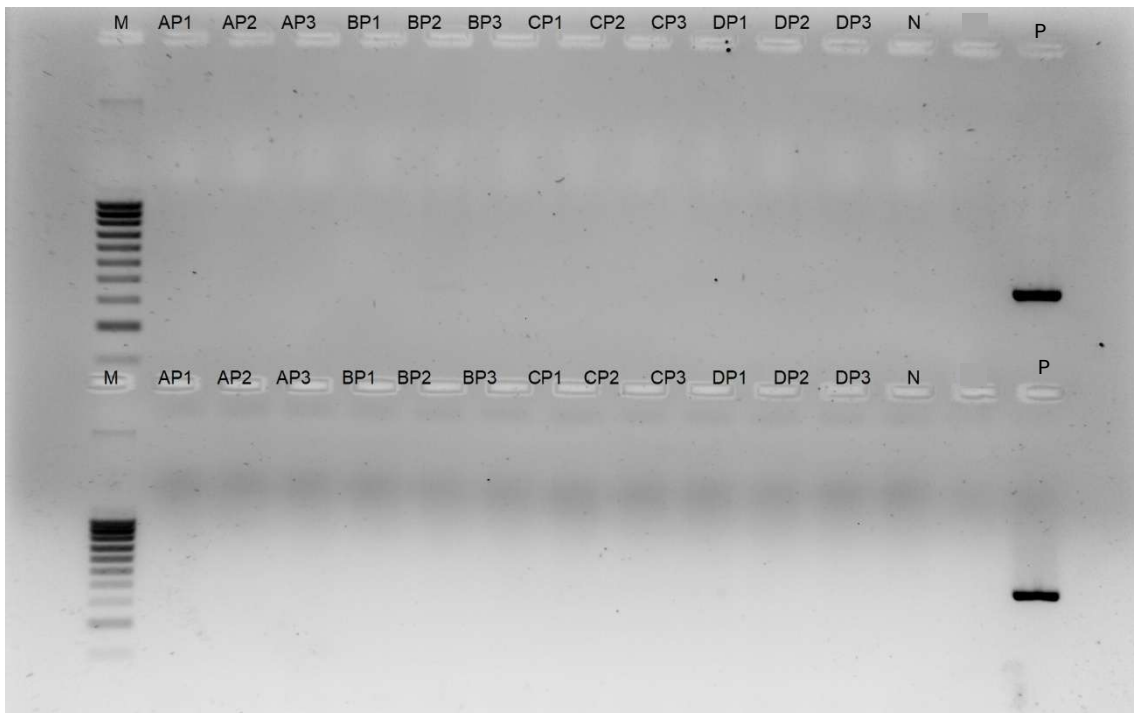


Figura 16. Resultados da amplificação por PCR de DNA de *T. maritimum* em amostras de pele (linha superior) e brânquias (linha inferior) de peixes do grupo controle não infetado, 48 horas após a infecção por imersão. (M –

Marcador de peso molecular (DNA ladder); N – Controlo negativo (sem molde); P – Controlo positivo; AP1 – peixe 1 alimentado com o tratamento A (dieta controlo); AP2 – peixe 2 alimentado com o tratamento A (dieta controlo); AP3 – peixe 3 alimentado com o tratamento A (dieta controlo); BP1 – peixe 1 alimentado com o tratamento B (dieta 1); BP2 – peixe 2 alimentado com o tratamento B (dieta 1); BP3 – peixe 3 alimentado com o tratamento B (dieta 1); CP1 – peixe 1 alimentado com o tratamento C (dieta 2); CP2 – peixe 2 alimentado com o tratamento C (dieta 2); CP3 – peixe 3 alimentado com o tratamento C (dieta 2); DP1 – peixe 1 alimentado com o tratamento D (dieta 3); DP2 – peixe 2 alimentado com o tratamento D (dieta 3); DP3 – peixe 3 alimentado com o tratamento D (dieta 3).

Página deixada intencionalmente em branco

4. Discussão

A bactéria Gram-negativa *T. maritimum*, agente causador da tenacibaculose marinha, representa um desafio significativo para a indústria da aquicultura mundial, dada a complexidade da sua prevenção e controlo (Escribano et al., 2024). Apesar das consequências potencialmente devastadoras, a patogénese desta bactéria ainda não é totalmente compreendida (Ferreira et al., 2024). Neste estudo, juvenis de robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*), foram alimentados durante 34 dias, com dietas experimentais, formuladas por uma empresa comercial, de modo a determinar se estas influenciam o crescimento e potenciam a resposta imunitária dos peixes quando desafiados com *Tenacibaculum maritimum* por imersão.

Durante o ensaio, não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas na taxa de crescimento específico (SGR) e no índice de conversão alimentar (FCR) entre os peixes alimentados com as 4 dietas testadas ($p > 0,05$). Apesar disso, verificou-se que o Tratamento B (dieta 1) apresentou tendência para um melhor desempenho, evidenciando um SGR superior ($1,29 \pm 0,10\%/dia$) e FCR inferior ($1,13 \pm 0,08$) em comparação com os restantes tratamentos, enquanto o Tratamento D (dieta 3) apresentou o pior FCR ($1,33 \pm 0,31$) e SGR ($1,16 \pm 0,25\%/dia$). Embora estas diferenças não tenham significância estatística, o padrão observado acompanha tendências descritas na literatura para dietas funcionais enriquecidas com macroalgas em peixes marinhos. Passos et al. (2021b) reportaram que a inclusão de *Gracilaria gracilis* em dietas para robalo-europeu pode melhorar a eficiência alimentar e favorecer o crescimento, e Passos et al. (2021a) demonstraram efeitos semelhantes em dourada (*Sparus aurata*), com melhorias no ganho de peso e conversão alimentar, ainda que nem sempre estatisticamente significativas. Estes resultados sugerem que ensaios de curta duração podem não captar diferenças significativas, mas permitem detetar tendências relevantes para a formulação de dietas comerciais. Estudos prévios também indicam que a suplementação com aditivos funcionais pode melhorar a digestibilidade, o crescimento e a imunocompetência dos peixes (Onomu & Okuthe, 2024), o que reforça o potencial das dietas testadas apesar da ausência de diferenças estatisticamente confirmadas neste ensaio.

As condições ambientais têm influência na manifestação da doença, a qualidade da água desempenha um papel determinante na virulência e na proliferação da bactéria *T. maritimum* (Avendaño-Herrera et al., 2006a; Toranzo et al., 2005). No presente estudo, os valores médios registados foram de $25,0 \pm 0,89$ °C para a temperatura, $34,7 \pm 0,73$ para a salinidade, $6,6 \pm 0,13$ mg/L (95,7 %) para o oxigénio dissolvido e $0,1 \pm 0,21$ mg/L para a amónia. Estes parâmetros refletem boas condições de cultivo para *D. labrax*, mas poderão não ter favorecido suficientemente o crescimento e a expressão de fatores de virulência por parte da estirpe A155 de *T. maritimum*, limitando a progressão da infeção até níveis clínicos. Adicionalmente, estudos anteriores sugerem que pequenas variações em fatores ambientais, como a salinidade e a oxigenação, podem modular a sobrevivência e a patogenicidade de *T. maritimum*. Por exemplo, Småge et al. (2016) reportaram que a alteração da salinidade influencia não só a viabilidade da bactéria, mas também a gravidade dos sinais clínicos nos hospedeiros. Assim, é plausível que, apesar de as condições registadas terem sido ideais para o bem-estar dos peixes, não tenham criado um ambiente suficientemente favorável ao desenvolvimento clínico da tenacibaculose, levando à ausência de mortalidade e de manifestações típicas da doença. Poderá também estar relacionada com a influência da microbiota cutânea e branquial, que desempenha um papel essencial na defesa contra agentes patogénicos. A microbiota residente na superfície dos peixes, quando em equilíbrio, atua como uma barreira biológica, competindo com potenciais patógenos por espaço e nutrientes. Lowrey et al. (2015) destacaram que a microbiota associada a tecidos mucosos dos peixes desempenha um papel protetor essencial, limitando a colonização de bactérias oportunistas e patogénicas. Neste contexto, é plausível que os peixes utilizados no presente estudo, mantidos em boas condições zootécnicas, tenham apresentado uma microbiota estável e funcional, capaz de impedir a adesão e proliferação de *T. maritimum*. Esta hipótese ganha relevância ao considerar que a colonização inicial da pele e das brânquias é um passo crítico no estabelecimento da infeção (Avendaño-Herrera et al., 2008; Fernández-Álvarez & Santos, 2018).

Procedimentos experimentais de infeção com patógenos utilizando desafios por imersão têm sido amplamente utilizados dado que tendem a reproduzir de forma mais fidedigna o processo natural de infeção, quando comparados com os desafios por

injeção. A imersão não contorna a primeira linha de defesa dos peixes, a barreira de muco cutâneo, ao contrário das vias mais comuns de injeção subcutânea, intraperitoneal e intramuscular. Em robalo-europeu, desafios por imersão demonstraram ativar respostas imunitárias mucosas precoces na pele, brânquias e intestino posterior, coerentes com o contacto direto do agente com as superfícies epiteliais (Mabrok et al., 2023). A análise comparativa de protocolos de desafios torna-se complexa devido à influência de múltiplos fatores que influenciam a patogenicidade, tais como a estirpe bacteriana, as condições de cultura (meio de crescimento e temperatura), a dose utilizada, a duração da imersão, as características físicas e químicas da água, a densidade populacional, a alimentação, a espécie hospedeira, a idade e a resistência (López et al., 2022).

Em diferentes espécies de peixes, a infeção por *T. maritimum* caracteriza-se por sinais clínicos bem definidos, frequentemente incluindo pequenas lesões cutâneas, perda de escamas e desintegração da epiderme, que podem evoluir para úlceras necróticas (Haridy et al., 2015; Lopez et al., 2021; Van Gelderen et al., 2011; Vilar et al., 2012). Em casos mais graves, são também descritos quadros de estomatite hemorrágica, necrose branquial acompanhada de hiperplasia lamelar e produção excessiva de muco, podendo ainda ocorrer lesões oculares (Ferreira, 2024; Frisch et al., 2018; Powell et al., 2004). No entanto, os resultados obtidos no presente estudo diferem substancialmente do padrão clássico da tenacibaculose. Apesar do desafio por imersão durante 2 horas a uma suspensão de *T. maritimum* de $5,5 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, os peixes apresentaram uma taxa de sobrevivência de 100%, sem sinais típicos da doença.

Estes resultados contrastam com estudos anteriormente reportados por Avendaño-Herrera et al. (2006c), que sugerem que a infeção por imersão é a melhor abordagem para induzir a tenacibaculose no robalo-europeu, uma vez que foi um modelo eficaz para reproduzir a doença em juvenis com cerca de 15–25 g, expostos por 1–2 horas entre 10^6 e 10^7 UFC mL⁻¹, resultando em mortalidades de 60–80% entre 24 horas e 10 dias após o desafio, acompanhadas de sinais clínicos típicos como hemorragia e erosão na boca. Sendo que estes utilizaram a estirpe PC424.1, de *T. maritimum*, isolada de pregado (*Scophthalmus maximus*) com sintomas.

Por outro lado, resultados semelhantes aos do presente estudo foram descritos por Ferreira et al. (2024), evidenciando que determinadas estirpes de *T. maritimum* podem induzir respostas inflamatórias, sem desencadear o quadro clínico típico da tenacibaculose, especialmente quando utilizados métodos de desafio menos agressivos ou estirpes de virulência reduzida. A ausência de sinais clínicos e de mortalidade observada neste estudo poderá estar relacionada com a baixa virulência da estirpe A155 de *T. maritimum*, isolada de *Solea senegalensis*, cuja patogenicidade para *D. labrax* poderá ser limitada, não apresentando a mesma capacidade de infecção noutras espécies hospedeiras. Esta interpretação é suportada por estudos que demonstram que diferentes isolados de *T. maritimum* apresentam níveis variáveis de virulência, incluindo estirpes incapazes de induzir tenacibaculose mesmo após inoculação experimental (Bridel et al., 2020).

Porém, a ausência de mortalidade e de sinais clínicos observada no presente estudo não deve ser atribuída unicamente a uma suposta baixa virulência da estirpe A155 de *T. maritimum*, uma vez que está bem documentado que o desfecho da infecção depende do protocolo de desafio utilizado. Por exemplo, Ferreira et al. (2024) desafiaram juvenis de robalo-europeu, utilizando a estirpe ACC13.1 isolada de linguado-senegalês, (*D. labrax*, 30–40 g) por imersão a $5,5 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ durante 2 h a 24–25 °C e reportaram uma mortalidade total ao 7º dia após a infecção, demonstrando que uma concentração relativamente próxima da usada no presente estudo pode induzir a doença. De forma semelhante, Carvalho et al. (2025) utilizaram juvenis de robalo (35 g) e aplicaram uma infecção por imersão com a estirpe ACC13.1 a 1×10^6 UFC mL⁻¹ durante 2 h a $24 \pm 0,5$ °C, obtendo uma mortalidade cumulativa entre 85 % e 95 % após uma semana, com as primeiras mortes registadas 24 horas após a infecção. Em contraste, em linguado-senegalês (*Solea senegalensis*, 20–25 g), Mabrok et al. (2016) realizaram infecções por imersão de 24 h a 16–23 °C com diferentes estirpes, incluindo ACC6.1 e ACC13.1, com doses entre $2,6 \times 10^5$ e $2,6 \times 10^7$ UFC mL⁻¹, e observaram mortalidade muito elevada, atingindo 100 % em menos de 4 dias, para a maior dose.

Previamente a este ensaio, foram realizados ensaios no nosso laboratório com *Tenacibaculum maritimum*. Num dos ensaios utilizou-se a estirpe LMG11612, isolada de *Pagrus major*, numa infecção por injeção subcutânea numa dose 10^6 UFC por peixe, sendo

que não foi registada mortalidade nem sinais clínicos em *D. labrax* sob condições experimentais semelhantes, reforçando a hipótese de que a ausência de doença poderá estar relacionada não só com o protocolo de desafio utilizado, mas também com o patógeno. Realizaram-se também ensaios com a estirpe utilizada no presente estudo aumentando o tempo de imersão para 18h e 24h, sendo que também não foi registada qualquer mortalidade nem sinais clínicos. Estes resultados indicam-nos que é essencial, para ensaios de infeção futuros, a definição de um modelo de infeção que funcione para as diversas estirpes desta bactéria. Este modelo de infeção poderá considerar pequenas alterações nos desenhos experimentais do desafio (estirpe bacteriana, dose utilizada, duração da infeção, temperatura, salinidade da água e densidade de peixes).

Estudos prévios demonstraram que frequentemente são necessárias concentrações bacterianas elevadas ou desafios mais prolongados para induzir sinais clínicos típicos de tenacibaculose. Num ensaio com 3 estirpes isoladas de *Solea senegalensis* (PC503.1 e ACC6.1), e de *Scophthalmus maximus* (PC424.1), Avendaño-Herrera et al. (2006b) reportaram que apenas exposições prolongadas, com duração até 18 horas, foram eficazes na indução consistente da doença em pregado (*Scophthalmus maximus*), sendo que períodos mais curtos não resultaram na manifestação clínica da infeção. Um estudo recente envolvendo o salmão chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), no qual foram utilizadas as estirpes CCCM20/006, CCCM20/102 e CCCM20/133 isoladas do mesmo, demonstrou que a exposição a uma concentração muito mais elevada (2×10^8 UFC/mL) levou à observação de sinais clínicos evidentes de tenacibaculose e a mortalidade significativa, dependendo do tipo de estirpe utilizada (Kumanan et al., 2025). Além disso, Yamamoto et al. (2010) desenvolveram um método de desafio por imersão para *Paralichthys olivaceus*, no qual a exposição foi relativamente curta (30 minutos), mas realizada com concentrações bacterianas elevadas (10^7 – 10^8 UFC mL⁻¹) e em peixes previamente sujeitos a pequenas abrasões cutâneas, de modo a facilitar a entrada do patógeno. Long et al. (2014) realizaram um teste de imersão e observaram que a mortalidade foi significativamente maior nos peixes que apresentavam cicatrizes em comparação com aqueles que não tinham sido pré-tratados dessa forma (81,5% contra 19,4%). Taxas de mortalidade semelhantes foram relatadas quando os juvenis foram comprometidos com uma incisão abaixo da barbatana dorsal antes do desafio por

imersão (Madetoja et al., 2000). Num estudo posterior ao de Long et al. (2014), Macchia et al. (2022), com a bactéria *Flavobacterium psychrophilum* em salmão do atlântico (*Salmo salar*), os juvenis foram imersos previamente em peróxido de hidrogénio (200 mg/L) durante 1 hora em tanques arejados com o fluxo de água interrompido, antes do desafio bacteriano para remover parte do muco da superfície e expor a pele às bactérias. Nessas condições, os autores obtiveram infeções eficientes com sinais clínicos típicos de tenacibaculose. Estes resultados sugerem que, para que a infeção se manifeste, poderá ser necessário intensificar o desafio experimental através de maiores doses bacterianas ou exposições mais longas, ou até uma abrasão prévia da pele, especialmente quando se trata de estirpes menos virulentas ou espécies com defesas naturais eficientes.

Outro fator a considerar é a condição fisiológica e sanitária dos peixes utilizados. Animais mantidos em boas condições zootécnicas e sem historial de stress prévio tendem a apresentar respostas imunitárias mais eficazes e, conseqüentemente, maior resistência à infeção (Toranzo et al., 2005). Antes do início do ensaio alimentar, foram realizados testes ELISA a 15 indivíduos tendo os resultados indicado valores de densidade ótica próximos de zero para anticorpos específicos contra *T. maritimum*, sugerindo ausência de anticorpos detetáveis e, portanto, ausência de exposição prévia ao patógeno ou uma exposição insuficiente para induzir uma resposta humoral mensurável.

A ausência de mortalidade e de sinais clínicos após o desafio poderá refletir a capacidade dos mecanismos imunitários inatos em controlar a colonização inicial do agente patogénico, especialmente em peixes mantidos em condições ambientais controladas. Embora não se possa afirmar que tenha ocorrido uma resposta adaptativa específica, é plausível que a imunidade inata tenha desempenhado um papel central na contenção da infeção. Complementarmente, os testes de ELISA realizados após a infeção revelaram níveis muito baixos de anticorpos totais em todos os grupos, com uma ligeira tendência para valores superiores no grupo controlo (CA) e nos peixes infetados alimentados com o tratamento D (dieta 3) (ID). Estes resultados poderão refletir apenas uma ativação basal do sistema imunitário humoral, sem evidenciar uma resposta adaptativa específica face ao patógeno. Relativamente aos anticorpos específicos contra *T. maritimum*, não se observaram diferenças relevantes entre grupos controlo e

infetados, permanecendo os níveis globais reduzidos. Tal ausência de resposta específica está em concordância com a inexistência de mortalidade e de sinais clínicos registados, sugerindo que a imunidade inata poderá ter desempenhado um papel predominante no controlo da infeção.

Nos resultados da deteção de *T. maritimum*, a amplificação por PCR permitiu confirmar a presença de DNA de *T. maritimum* em amostras de pele e brânquias 24 horas após a infeção por imersão, indicando que a bactéria estava presente nos peixes expostos. No entanto, a intensidade reduzida das bandas em várias amostras, bem como a ausência de amplificação em alguns casos pontuais (tratamento B (dieta 1)), sugerem que a colonização inicial terá sido limitada e heterogénea entre indivíduos. Este padrão é consistente com ausência de doença (Gomez & Salinas, 2013). Ao fim de 48 horas, a maioria das amostras revelou-se negativa para a presença de DNA de *T. maritimum*, sendo apenas detetadas bandas residuais de fraca intensidade em duas amostras (1 amostra do tratamento D (dieta 3) – pele; 1 amostra do tratamento B (dieta 1) – brânquias). Esta rápida eliminação do DNA bacteriano reforça a hipótese de que o patógeno não conseguiu proliferar nos tecidos, sendo rapidamente controlado pelas barreiras de defesa do hospedeiro. É plausível que, embora o desafio tenha permitido a adesão inicial da bactéria, condições ambientais menos favoráveis ao desenvolvimento da infeção e a eficácia dos mecanismos imunitários inatos dos peixes, tenha impedido a progressão da colonização. Além disso, a deteção de DNA bacteriano demonstra que a infeção não se estabeleceu de forma persistente, o que poderá explicar também os resultados negativos dos testes de ELISA para anticorpos específicos. Não terá ocorrido uma estimulação suficiente do sistema imunitário adaptativo para desencadear uma resposta humoral mensurável. Este resultado é coerente com o padrão típico da resposta humoral em teleósteos, onde a produção de anticorpos específicos pode demorar várias semanas a surgir e requer uma infeção suficientemente estabelecida para induzir memória adaptativa (Magnadóttir, 2006; Salinas, 2015).

Página deixada intencionalmente em branco

5. Conclusão e perspectivas futuras

Atualmente, as doenças bacterianas representam uma das principais limitações ao crescimento sustentável da aquacultura, causando perdas significativas sobretudo em fases juvenis e condicionando a rentabilidade da produção. Entre estas, a tenacibaculose, causada por *Tenacibaculum maritimum*, é considerada uma das infeções mais relevantes, estando associada a mortalidade elevada e a lesões cutâneas graves em diversas espécies. A procura de estratégias eficazes para a sua prevenção e controlo tem vindo a privilegiar abordagens nutricionais, uma vez que as dietas experimentais, para além de promoverem o crescimento e a eficiência alimentar, podem modular a resposta imunitária e aumentar a resistência dos peixes perante os agentes patogénicos. No caso do robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*), uma das espécies de maior interesse económico, compreender a interação entre nutrição, imunidade e patogenicidade bacteriana é essencial para o desenvolvimento de soluções que contribuam para a sustentabilidade do setor.

No presente estudo, observou-se que algumas dietas testadas promoveram melhorias no crescimento, em particular na taxa de crescimento específico e na eficiência alimentar, apesar destas não apresentarem diferenças estatisticamente significativas. Contudo, estas não se traduziram em proteção adicional face ao desafio com *T. maritimum*. Detetou-se a presença de DNA bacteriano por PCR nas primeiras 24 horas, sendo este o único ponto de amostragem que revelou a presença da mesma. Também não se registaram sinais clínicos nem mortalidade, o que sugere uma infeção limitada. Este trabalho contribui para o conhecimento da interação entre dietas experimentais e *T. maritimum* em robalo-europeu, reforçando a necessidade de definir um modelo de infeção eficiente para futuros ensaios. Os objetivos deste estudo não foram alcançados, uma vez que não se observaram sinais clínicos nem ocorreram mortalidades durante o período experimental após a administração de dietas formuladas para oferecer uma maior resistência ao patógeno.

Para futuros ensaios, considero fundamental otimizar o protocolo de infeção, tendo tempos de exposição mais prolongados ou doses bacterianas superiores. Poderia

igualmente clarificar o papel das barreiras naturais do hospedeiro no estabelecimento da infeção e avaliar de forma mais clara o impacto das dietas experimentais na resposta do robalo-europeu. A disponibilização de informação detalhada sobre a composição das dietas testadas constituiria uma vantagem, uma vez que permitiria interpretar de forma mais precisa os mecanismos nutricionais envolvidos e identificar a eventual contribuição de compostos com propriedades imunomoduladoras, caso tivesse ocorrido mortalidade.

Referências

- Alsina, M. E. R. C. E. D. E. S., & Blanch, A. R. (1993). First isolation of *Flexibacter maritimus* from cultivated turbot (*Scophthalmus maximus*). *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 13(5), 157-160.
- Arthur, J. R., Lavilla-Pitogo, C. R., & Subasinghe, R. P. (2000). Use of chemicals in aquaculture in Asia: proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals in Aquaculture in Asia, 20-22 May 1996, Tigbauan, Iloilo, Philippines. Southeast Asian Fisheries Development Center, Aquaculture Dept.
- Avendaño-Herrera, R., Irgang, R., Magariños, B., Romalde, J. L., & Toranzo, A. E. (2006c). Use of microcosms to determine the survival of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* in seawater. *Environmental Microbiology*, 8(5), 921–928.
- Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., López-Romalde, S., Romalde, J. L., & Toranzo, A. E. (2004b). Phenotypic characterization and description of. *Diseases of aquatic organisms*, 58, 1–8.
- Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., Moriñigo, M. A., Romalde, J. L., & Toranzo, A. E. (2005). A novel O-serotype in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). In *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol* (Vol. 25, Issue 2).
- Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., Toranzo, A. E., Beaz, R., & Romalde, J. L. (2004a). Species-specific polymerase chain reaction primer sets for the diagnosis of *Tenacibaculum maritimum* infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62(1–2), 75–83.
- Avendaño-Herrera, R., Núñez, S., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (2008). Evolution of drug resistance and minimum inhibitory concentration to enrofloxacin in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated in fish farms. *Aquaculture International*, 16(1), 1–11.
- Avendaño-Herrera, R., Nunez, S., Magarinos, B., Toranzo, A., Avendaño-Herrera, R., Núñez, S., & Toranzo, A. E. (2004a). A non-destructive method for rapid detection of *Tenacibaculum maritimum* in farmed fish using nested PCR amplification. In *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol* (Vol. 24, Issue 6).
- Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A. E., & Magariños, B. (2006a). 2006 Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. *Diseases of aquatic organisms*, 71, 255–266.
- Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A. E., & Magariños, B. (2006b). A challenge model for *Tenacibaculum maritimum* infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 29(6).

- Bader, J. A., & Shotts Jr, E. B. (1998). Identification of *Flavobacterium* and *Flexibacter* species by species-specific polymerase chain reaction primers to the 16S ribosomal RNA gene. *Journal of Aquatic Animal Health*, 10(4), 311-319.
- Baxa, D. V., Kawai, K., & Kusuda, R. (1986). Characteristics of gliding bacteria isolated from diseased cultured flounder, *Paralichthys olivaceous*. *Fish Pathology*, 21(4), 251-258.
- Bernardet, J.-F., Kerouault, B., & Michel, C. (1994). Comparative Study on *Flexibacter maritimus* Strains Isolated from Farmed Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) in France.
- Bridel, S., Bourgeon, F., Marie, A., Saulnier, D., Pasek, S., Nicolas, P., ... & Duchaud, E. (2020). Genetic diversity and population structure of *Tenacibaculum maritimum*, a serious bacterial pathogen of marine fish: From genome comparisons to high throughput MALDI-TOF typing. *Veterinary research*, 51(1), 60.
- Brosnahan, C. L., Georgiades, E., McDonald, C., Keeling, S. E., Munday, J. S., & Jones, B. (2019). Optimisation and validation of a PCR to detect viable *Tenacibaculum maritimum* in salmon skin tissue samples. *Journal of Microbiological Methods*, 159, 186–193.
- Brosnahan, C. L., Georgiades, E., McDonald, C., Keeling, S. E., Munday, J. S., & Jones, B. (2019). Optimisation and validation of a PCR to detect viable *Tenacibaculum maritimum* in salmon skin tissue samples. *Journal of Microbiological Methods*, 159, 186–193.
- Buller, N. B. (2014). *Bacteria and Fungi from Fish and Other Aquatic Animals*. 2nd Edition. A practical identification manual.
- Cameira Vaz, M. C. (2021). Avaliação do potencial antiviral de extratos em robalos (*Dicentrarchus labrax*) infetados com o vírus da necrose nervosa (VNN).
- Carvalho, I., Peixoto, D., Ferreira, I., Robledo, D., Ramos-Pinto, L., Silva, R. M., ... & Costas, B. (2025). Exploring the effects of dietary methionine supplementation on European seabass mucosal immune responses against *Tenacibaculum maritimum*. *Frontiers in Immunology*, 16, 1513516.
- Casadevall, A., & Pirofski, L.-A. (1999). Host-Pathogen Interactions: Redefining the Basic Concepts of Virulence and Pathogenicity. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 67, Issue 8).
- Cepeda, C., & Santos, Y. (2002). First isolation of *Flexibacter maritimus* from farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) in Spain. In *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol* (Vol. 22, Issue 6).
- Chakraborty, S. B., Horn, P., & Hancz, C. (2014). Application of phytochemicals as growth-promoters and endocrine modulators in fish culture. *Reviews in Aquaculture*, 6(1), 1-19.

- Dalmo, R. A., & Seljelid, R. (1995). The immunomodulatory effect of LPS, laminaran and sulphated laminaran [β (1, 3) -D-glucan] on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., macrophages in vitro. *Journal of fish diseases*, 18(2), 175-185.
- Devesa, S., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (1989). Ulcerative skin and fin lesions in reared turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 12(4), 323–333.
- Escribano, M. P., Balado, M., Santos, B., Toranzo, A. E., Lemos, M. L., & Magariños, B. (2024). Outer membrane vesicles (OMVs) from *Tenacibaculum maritimum* as a potential vaccine against fish tenacibaculosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 154, 109943.
- Escribano, M. P., Balado, M., Toranzo, A. E., Lemos, M. L., & Magariños, B. (2023). The secretome of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* includes soluble virulence-related proteins and outer membrane vesicles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1197290.
- Escribano, M. P., Ramos-Pinto, L., Fernández-Boo, S., Afonso, A., Costas, B., & Guardiola, F. A. (2020). Mucosal immune responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles after *Tenacibaculum maritimum* challenge: A comparative study between ocular and blind sides. *Fish and Shellfish Immunology*, 104, 92–100.
- Faílde, L. D., Losada, A. P., Bermúdez, R., Santos, Y., & Quiroga, M. I. (2013). *Tenacibaculum maritimum* infection: Pathology and immunohistochemistry in experimentally challenged turbot (*Psetta maxima* L.). *Microbial Pathogenesis*, 65, 82–88.
- FAO. (2024). The State of World Fisheries and Aquaculture 2024. In *The State of World Fisheries and Aquaculture 2024*. FAO.
- Fernández Sánchez, J. L., Le Breton, A., Brun, E., Vendramin, N., Spiliopoulos, G., Furones, D., & Basurco, B. (2022). Assessing the economic impact of diseases in Mediterranean grow-out farms culturing European sea bass. *Aquaculture*, 547.
- Fernández-Álvarez, C., & Santos, Y. (2018). Identification and typing of fish pathogenic species of the genus *Tenacibaculum*. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 102, Issue 23, pp. 9973–9989). Springer Verlag.
- Ferreira, I. A. (2024). *Tenacibaculum maritimum* pathogenesis: Crosstalk between host and pathogen and beyond (Tese de doutoramento, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto).
- Ferreira, I. A., Peixoto, D., Losada, A. P., Quiroga, M. I., Vale, A. do, & Costas, B. (2023). Early innate immune responses in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) following *Tenacibaculum maritimum* infection. *Frontiers in Immunology*, 14.
- Ferreira, I. A., Santos, P., Moxó, J. S., Teixeira, C., do Vale, A., & Costas, B. (2024). *Tenacibaculum maritimum* can boost inflammation in *Dicentrarchus labrax* upon

- peritoneal injection but cannot trigger tenacibaculosis disease. *Frontiers in Immunology*, 15.
- Ferreira, M., Machado, M., Mota, C. S. C., Abreu, H., Silva, J., Maia, M. R. G., Kiron, V., Costas, B., & Valente, L. M. P. (2023). Micro- and macroalgae blend modulates the mucosal and systemic immune responses of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) upon infection with *Tenacibaculum maritimum*. *Aquaculture*, 566.
- Fringuelli, E., Savage, P. D., Gordon, A., Baxter, E. J., Rodger, H. D., & Graham, D. A. (2012). Development of a quantitative real-time PCR for the detection of *Tenacibaculum maritimum* and its application to field samples. *Journal of Fish Diseases*, 35(8), 579-590.
- Frisch, K., Småge, S. B., Vallestad, C., Duesund, H., Brevik, J., Klevan, A., Olsen, R. H., Sjaatil, S. T., Gauthier, D., Brudeseth, B., & Nylund, A. (2018). Experimental induction of mouthrot in Atlantic salmon smolts using *Tenacibaculum maritimum* from Western Canada. *Journal of Fish Diseases*, 41, 1247–1258.
- Gomez, D., Sunyer, J. O., & Salinas, I. (2013). The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 1729-1739.
- Gonçalves, A. T., Simões, M., Costa, C., Passos, R., & Baptista, T. (2022). Modulatory effect of *Gracilaria gracilis* on European seabass gut microbiota community and its functionality. *Scientific Reports*, 12(1), 14836.
- Güroy, B., Güroy, D., Bilen, S., Kenanoğlu, O. N., Şahin, I., Terzi, E., Karadal, O., & Mantoğlu, S. (2022). Effect of dietary Spirulina (*Arthrospira platensis*) on the growth performance, immune-related gene expression and resistance to *Vibrio anguillarum* in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Research*, 53(6), 2263–2274.
- Handlinger, J., Soltani, M., & Percival, S. (1997). The pathology of *Flexibacter maritimus* in aquaculture species in Tasmania, Australia. *Journal of Fish Diseases*, 20(3), 159–168.
- Hardy, R. W. (2001). Nutritional deficiencies in commercial aquaculture: likelihood, onset, and identification. *Nutrition and Fish Health*, 131-147.
- Haridy, M., Mahmoud, H., Abd El-Galil, M., Sakai, H., & Yanai, T. (2015). Pathological Findings of *Tenacibaculum maritimum* Infection in Black Damsel fish, *Neoglyphieodon melas* and Picasso Triggerfish, *Rhinacanthus assasi* in Red Sea, Egypt. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 06, 1–5.
- Holmes, B. (1992) Synonymy of *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986 and *Cytophaga marina* Reichenbach 1989. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42(1), 185–185.

- Jacob-Lopes, E., Maroneze, M. M., Deprá, M. C., Sartori, R. B., Dias, R. R., & Zepka, L. Q. (2019). Bioactive food compounds from microalgae: An innovative framework on industrial biorefineries. *Current Opinion in Food Science*, 25, 1-7.
- Kiron, V. (2012). Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology*, 173(1–2), 111–133.
- Kordon, A. O., Pinchuk, L., & Karsi, A. (2021). Adaptive immune system in fish. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 22(4).
- Kumanan, K., Carson, J., Hunter, R. B., Rolton, A., von Ammon, U., Bandaranayake, C., ... & Hutson, K. S. (2025). Experimental Challenge of Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) with *Tenacibaculum maritimum* and *Tenacibaculum dicentrarchi* Fulfils Koch's Postulates. *Journal of Fish Diseases*, 48(6), e14088.
- Le Breton, A. D. (2009). Vaccines in Mediterranean aquaculture: practice and needs. *Options Méditerranéennes*, 86, 147-154.
- Li, P., & Gatlin III, D. M. (2006). Nucleotide nutrition in fish: current knowledge and future applications. *Aquaculture*, 251(2-4), 141-152.
- Long, A., Fehring, T. R., LaFrentz, B. R., Call, D. R., & Cain, K. D. (2014). Development of a waterborne challenge model for *Flavobacterium psychrophilum*. *FEMS microbiology letters*, 359(2), 154-160.
- Lopez, P., Saulnier, D., Swarup-Gaucher, S., David, R., Lau, C., Taputuarai, R., Belliard, C., Basset, C., Labrune, V., Marie, A., Bernardet, J. F., & Duchaud, E. (2021). First isolation of virulent *Tenacibaculum maritimum* strains from diseased orbicular batfish (*Platax orbicularis*) farmed in Tahiti Island. *BioRxiv*, 11, 131.
- Lopez, P., Saulnier, D., Swarup-Gaucher, S., David, R., Lau, C., Taputuarai, R., ... & Duchaud, E. (2022). Primeiro isolamento de isolados virulentos de *Tenacibaculum maritimum* de peixes-morcego orbiculares doentes (*Platax orbicularis*) cultivados na ilha do Taiti. *Patógenos*, 11 (2), 131.
- Lowrey, L., Woodhams, D. C., Tacchi, L., & Salinas, I. (2015). Topographical mapping of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) microbiome reveals a diverse bacterial community with antifungal properties in the skin. *Applied and environmental microbiology*, 81(19), 6915-6925.
- Mabrok, M., Algammal, A. M., Sivaramasamy, E., Hetta, H. F., Atwah, B., Alghamdi, S., Fawzy, A., Avendaño-Herrera, R., & Rodkhum, C. (2023). Tenacibaculosis caused by *Tenacibaculum maritimum*: Updated knowledge of this marine bacterial fish pathogen. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A.
- Mabrok, M., Machado, M., Serra, C. R., Afonso, A., Valente, L. M. P., & Costas, B. (2016). Tenacibaculosis induction in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and studies

- of *Tenacibaculum maritimum* survival against host mucus and plasma. *Journal of Fish Diseases*, 39(12), 1445–1455.
- Macchia, V., Inami, M., Ramstad, A., Grammes, F., Reeve, A., Moen, T., ... & Hoare, R. (2022). Immersion challenge model for *Flavobacterium psychrophilum* infection of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry. *Journal of Fish Diseases*, 45(11), 1781-1788.
- Machado, M., Cruz, F., Cunha, A., Ramos-Pinto, L., Laranjeira, A., Pacheco, M., ... & Costas, B. (2024). Dietary *Salicornia ramosissima* improves the European seabass (*Dicentrarchus labrax*) inflammatory response against *Photobacterium damsela piscicida*. *Frontiers in Immunology*, 15, 1342144.
- Madetoja, J., Nyman, P., & Wiklund, T. (2000). *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of aquatic organisms*, 43(1), 27-38.
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & shellfish immunology*, 20(2), 137-151.
- Masumura, K., & Wakabayashi, H. (1977). An outbreak of gliding bacterial disease in hatchery-born red seabream (*Pagrus major*) and gilthead (*Acanthopagrus schlegelii*) fry in Hiroshima. *Fish Pathology*, 12(3), 171-177.
- McVicar AH, White PG (1982) The prevention and cure of an infectious disease in cultivated juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.). *Aquaculture* 26:213–222
- McVicar, A. H., & White, P. G. (1979). Fin and skin necrosis of cultivated Dover sole (*Solea solea*) (L.). *Journal of Fish Diseases*, 2(6).
- Messina, M., Bulfon, C., Beraldo, P., Tibaldi, E., & Cardinaletti, G. (2019). Intestinal morpho-physiology and innate immune status of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in response to diets including a blend of two marine microalgae, *Tisochrysis lutea* and *Tetraselmis suecica*. *Aquaculture*, 500, 660–669.
- Ofek, I., & Doyle, R. J. (2012). *Bacterial adhesion to cells and tissues*. Springer Science & Business Media.
- Ofek, I., and Doyle, R. J. (1994). Principles of bacterial adhesion. In: *Bacterial Adhesion to Cells and Tissues*. (Boston, MA: Springer).
- Oliva-Teles, A. (2012). Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of fish diseases*, 35(2), 83-108.
- Onomu, A. J., & Okuthe, G. E. (2024). The role of functional feed additives in enhancing aquaculture sustainability. *Fishes*, 9(5), 167.
- Passos, R., Correia, A. P., Ferreira, I., Pires, P., Pires, D., Gomes, E., Carmo, B. D., Santos, P., Simões, M., Afonso, C., & Baptista, T. (2021a). Effect on health status and

- pathogen resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed with diets supplemented with *Gracilaria gracilis*. *Aquaculture*, 531, 735888.
- Passos, R., Correia, A. P., Pires, D., Pires, P., Ferreira, I., Simões, M., Carmo, B. D., Santos, P., Pombo, A., Afonso, C., & Baptista, T. (2021b). Potential use of macroalgae *Gracilaria gracilis* in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*): Health benefits from a sustainable source. *Fish & shellfish immunology*, 119, 105-113.
- Pazos F, Santos Y, Núñez S, Toranzo AE (1993) Increasing occurrence of *Flexibacter maritimus* in the marine aqua culture of Spain. *FHS/AFS Newsl* 21:1–2
- Pepin, J. F., & Emery, A. (1993). Marine *cytophaga*-like bacteria (clb) isolated from diseased reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) From French mediterranean coast. In *bull. Eur. Ass. Fish pathol* (vol. 13, issue 5).
- Pohlenz, C., & Gatlin, D. M. (2014). Interrelationships between fish nutrition and health. *Aquaculture*, 431, 111–117.
- Ponton, F., Wilson, K., Holmes, AJ, Cotter, SC, Raubenheimer, D., & Simpson, SJ (2013). Integrando nutrição e imunologia: uma nova fronteira. *Journal of Insect Physiology*, 59 (2), 130-137.
- Powell, M., Carson, J., & Van Gelderen, R. (2004). Experimental induction of gill disease in Atlantic salmon *Salmo salar* smolts with *Tenacibaculum maritimum*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61, 179–185.
- Rainha, P. A. Da C. (2018). Produção de Espécies Endémicas da Costa Norte Portuguesa em Aquacultura Multitrófica Integrada (IMTA) (Master's thesis, Universidade do Porto (Portugal)).
- Resende, D., Costas, B., Sá, T., Golfetto, U., Machado, M., Pereira, M., Pereira, C., Marques, B., Rocha, C. M. R., Pintado, M., & Valente, L. M. P. (2022). Innovative swine blood hydrolysates as promising ingredients for European seabass diets: Impact on growth performance and resistance to *Tenacibaculum maritimum* infection. *Aquaculture*, 561.
- Rigos, G., & Troisi, G. M. (2005). Antibacterial agents in Mediterranean finfish farming: a synopsis of drug pharmacokinetics in important euryhaline fish species and possible environmental implications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15, 53-73.
- Rigos, G., Kogiannou, D., Padrós, F., Cristofol, C., Florio, D., Fioravanti, M., & Zarza, C. (2021). Best therapeutic practices for the use of antibacterial agents in finfish aquaculture: a particular view on European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) in Mediterranean aquaculture. *Reviews in aquaculture*, 13(3), 1285-1323.

- Ringø, E., Hoseinifar, S. H., Ghosh, K., Doan, H. V., Beck, B. R., & Song, S. K. (2018). Lactic acid bacteria in finfish—An update. *Frontiers in microbiology*, 9, 1818.
- Salinas, I. (2015). The mucosal immune system of teleost fish. *Biology*, 4(3), 525-539.
- Silva, A., Silva, S. A., Carpena, M., Garcia-Oliveira, P., Gullón, P., Barroso, M. F., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Macroalgae as a source of valuable antimicrobial compounds: Extraction and applications. In *Antibiotics* (Vol. 9, Issue 10, pp. 1–41). MDPI AG.
- Simões, I. J. V. (2011). Aplicação de protocolos experimentais para o estudo da infecção do linguado (*Solea senegalensis*) por *Tenacibaculum maritimum* (Master's thesis, Universidade do Porto (Portugal)).
- Småge, S. B., Frisch, K., Brevik, Ø. J., Watanabe, K., & Nylund, A. (2016). First isolation, identification and characterisation of *Tenacibaculum maritimum* in Norway, isolated from diseased farmed sea lice cleaner fish *Cyclopterus lumpus* L. *Aquaculture*, 464, 178-184.
- Smith, N. C., Rise, M. L., & Christian, S. L. (2019). A comparison of the innate and adaptive immune systems in cartilaginous fish, ray-finned fish, and lobe-finned fish. *Frontiers in immunology*, 10, 2292.
- Smyrli, M., Anka, I. Z., Koutsoni, O., Dotsika, E., Kyriazis, I. D., Pavlidis, M., & Katharios, P. (2022). Development of autogenous vaccines for farmed European seabass against *Aeromonas veronii* using zebrafish as a model for efficacy assessment. *Fish & Shellfish Immunology*, 123, 381-387.
- Soltani M, Burke CM (1994) Responses of fish-pathogenic Cytophaga/Flexibacter-like bacteria (CFLB) to environmental conditions. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 14: 185–187
- Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S., and Yamamoto, S. (2001). Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine cytophaga-like bacteria: Proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amyolyticum* sp. nov. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 51, 1639–1652.
- Tawfeek, WS, Kassab, AS, Okasha, LA, Abdelsalam, M., & Sherif, AH (2024). Características fenotípicas e genéticas de cepas de *Pseudomonas anguilliseptica* associadas à mortalidade em douradas e robalos cultivados. *Aquaculture International*, 32 (4), 3973-3992.
- Toranzo, A. E., Magariños, B., & Romalde, J. L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246(1-4), 37-61.

- Torrecillas, S., Montero, D., & Izquierdo, M. (2014). Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: potential mode of action. *Fish & shellfish immunology*, 36(2), 525-544.
- Toyama, T., Kita-Tsukamoto, K., & Wakabayashi, H. (1996). Identification of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR targeted 16S ribosomal DNA. *Fish Pathology*, 31(1), 25-31.
- Van Gelderen, R., Carson, J., & Nowak, B. (2011). Experimentally induced marine *flexibacteriosis* in Atlantic salmon smolts *Salmo salar*. II. Pathology. *Diseases of Aquatic Organisms*, 95, 125–135.
- Vieira, L., Filipe, D., Amaral, D., Magalhães, R., Martins, N., Ferreira, M., ... & Peres, H. (2023). Solid-state fermentation as green technology to improve the use of plant feedstuffs as ingredients in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Animals*, 13(17), 2692.
- Vilar, P., Faílde, L. D., Bermúdez, R., Vigliano, F., Rianza, A., Silva, R., Santos, Y., & Quiroga, M. I. (2012). Morphopathological features of a severe ulcerative disease outbreak associated with *Tenacibaculum maritimum* in cultivated sole, *Solea senegalensis* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 35, 437–445
- Wakabayashi, H., Hikida, M., & Masumura, K. (1986). *Flexibacter maritimus* sp. nov., a pathogen of marine fishes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36(3), 396-398.
- Yamamoto, T., Kawai, K., & Oshima, S. I. (2010). Evaluation of an experimental immersion infection method with *Tenacibaculum maritimum* in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Science*, 58(4), 481-489.

Página deixada intencionalmente em branco

Anexos

Tabela I- *Humane endpoints*

Proposal of a pain and distress score sheet for laboratory zebrafish.	
	Score
Physical Appearance*	
Normal	0
Missing operculum, and missing fins repeatedly, indicating possible antagonist behaviours; darkening /inflammation of fin	1
Mild scoliosis/ lordosis, tegument lesions, mucus production, over or under conditioned (obese or thin), abrupt colour change, especially blanching	2
General emaciation (low body to head ratio), general body deformities, missing or protuberant scales	3
Food consumption behaviour	
Normal	0
Unresponsive to food during the first meal	1
Unresponsive to food during 5 days, not even live food	2
Unresponsive to food during 1 week not even live food as artemia or rotifers	3
Respiratory behaviour	
Normal	0
Piping or extremely low rate, almost no opercular movement	3
Swimming behaviour	
Swimming through the water column	0
Difficulties to control buoyancy and/or to maintain equilibrium	2
Systematic swimming on the surface or in the bottom of the tank	3
Activity	
Normal	0
Hyperactive (erratic swimming) or hypoactive	2
Letargic, no reaction to external stimuli	3
Social behaviour	
Normal. Shoaling.	0
Individual often isolated when group-housed	1
Individual always chasing or being chased by conspecifics	2
Individual does not respond to conspecific behaviours towards him	3
TOTAL	
<p>Judgement: 0-1 Normal, 2-8 Monitor carefully. Consider veterinary treatment including analgesics and consider also to analyse water quality; 9-12 Suffering, provide relief, consult the specialized veterinarian, consider termination. 13-18 severe status, euthanasia, rethink experimental procedure. Euthanasia may be considered if a score of 3 is observed in any of the categories, except for behaviour-related categories, in which scores of 3 suggests repeated and close observation for a final decision regarding euthanasia. *Take in consideration organisms' age.</p>	